

**Fermentation und Verkapselung  
des nematophagen Pilzes  
*Hirsutella rhossiliensis*  
in Polyelektrolyt-Hohlkugeln  
zur biologischen Bekämpfung  
des Nematoden *Heterodera schachtii***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von  
Thomas Rose  
aus Uelzen

1. Referent: Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop

2. Referent: PD Dr. Siegmund Lang

eingereicht am: 14.12.2000

mündliche Prüfung (Disputation) am: 02.03.2001

2001

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

**Publikationen:**

Rose, T., Neumann, B., Thielking, H., Koch, W. und Vorlop, K.-D. (2000). Hollow beads of sulfoethylcellulose (SEC) on basis of polyelektrolyte complexes. Chemical Engineering & Technology 23, 9, 769-772.

Rose, T., Neumann, B., Thielking, H., Koch, W. und Vorlop, K.-D. (2000). Hohlkugeln aus Sulfoethylcellulose (SEC) auf Basis von Polyelektrolyt-Komplexen. Chemie Ingenieur Technik 1/2, 107-110.

**Tagungsbeiträge:**

Patel, A. V., Rose, T., Müller, J. und Vorlop, K.-D. (1997). Bekämpfung von phytopathogenen Nematoden mit einem verkapselten Pilz (Poster). Achema 1997, 09.-14. Juni 1997, Frankfurt am Main.

Rose, T., Patel, A. V., Müller, J. und Vorlop, K.-D. (1997). Bekämpfung von phytopathogenen Nematoden mit einem verkapselten Pilz (Poster). Biotechnica 1997, 21.-23. Oktober 1997, Hannover.

Rose, T., Patel, A. V., Müller, J. und Vorlop, K.-D. (1998). SEC – a new material for encapsulation of a nematophagous fungus as biological control agent (Poster). In: Alabouvette, C., Catroux, G., Lynch, J. (Hrsg.) Strategies of Microbial Inoculation for a Sustainable Agriculture (COST 830 Workgroup meeting / Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) am Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)), 17.-19. August 1998, Dijon, Frankreich.

Rose, T., Patel, A. V. und Vorlop, K.-D. (1998). Auswuchsverhalten eines verkapselten nematophagen Pilzes zur biologischen Nematodenbekämpfung (Poster). Kurzfassungen DECHEMA-Jahrestagungen 1998, 26.-28. Mai 1998, Wiesbaden, Band I, 221.

- Rose, T., Thielking, H., Koch, W. und Vorlop, K.-D. (1998). Neuartige Kapselsysteme (Hohlkugeln) auf Basis von Sulfoethylcellulose (SEC) (Poster). Kurzfassungen DEHEMA-Jahrestagungen 1998, 26.-28. Mai 1998, Wiesbaden, Band I, 171.
- Vorlop, K.-D., Müller, J., Patel, A. V. und Rose, T. (1998). Encapsulated Cells as Biological Control Agents (Vortrag). In: Alabouvette, C., Catroux, G., Lynch, J. (Hrsg.) Strategies of Microbial Inoculation for a Sustainable Agriculture (COST 830 Workgroup meeting / Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) am Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)), 17.-19. August 1998, Dijon, Frankreich.
- Patel, A. V., Rose, T., Gutberlet, V., Müller, J. und Vorlop, K.-D. (1999). Controlled release of *Hirsutella rhossiliensis* from hollow beads for Biological Control of plant-parasitic nematodes (Vortrag). Joint Meeting of The American Society of Parasitologists and The Society of Nematologists, 06.-09. Juli 1999, Monterey/Californien, USA.
- Patel, A. V., Rose, T., Müller, J. und Vorlop, K.-D. (1999). Controlled release of *Hirsutella rhossiliensis* from hollow beads for Biological Control of phytopathogenic nematodes (Vortrag). COST 830: Microbial Inoculants in Agriculture and Environment, Work Group 2: Formulation of microbial inoculants, 05.-06. Februar 1999, Braunschweig.
- Patel, A. V., Rose, T., Müller, J. und Vorlop, K.-D. (1999). Verkapselte nematophage Pilze zur Biologischen Nematodenbekämpfung (Vortrag). In: Deutsche Gartenbauwissenschaftliche Gesellschaft e. V. und Bundesverband der Diplomingenieure Gartenbau und Landespflege e. V. (BDGL) (Hrsg.) Kurzfassungen der Vorträge und Poster der 36. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung vom 03.-05. März in Dresden, BDGL-Schriftenreihe Band 17, 26.
- Prüße, U., Breford, J., Rose, T. und Vorlop, K.-D. (1999). Herstellung monodisperser sphärischer Partikel mit dem JetCutter®-Verfahren und SEC als geeignete Matrix für Hohlkugeln (Poster). Biotechnica 1999, 05.-07. Oktober 1999, Hannover.
- Rose, T., Gutberlet, V., Müller, J. und Vorlop, K.-D. (1999). Encapsulation of *Hirsutella rhossiliensis* for Biological Control of phytopathogenic nematodes (Poster). 9<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology (ECB9), 11.-15. Juli 1999, Brüssel, Belgien.



- Rose, T., Neumann, B., Thielking, H., Koch, W. und Vorlop, K.-D. (1999). Hollow Beads on basis of Sulfoethylcellulose (SEC) (Poster). 9<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology (ECB9), 11.-15. Juli 1999, Brüssel, Belgien.
- Rose, T., Neumann, B., Thielking, H., Koch, W. und Vorlop, K.-D. (1999). Hollow Beads on basis of the Polyelectrolyte Sulfoethylcellulose (SEC) (Poster). In: Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet Trondheim (Hrsg.). Programme and Extended Abstracts of the 8<sup>th</sup> International Workshop on Bioencapsulation, 13.-15. September 1999, Trondheim, Norwegen.
- Rose, T., Patel, A. V., Thielking, H., Koch, W., Gutberlet, V., Müller, J. und Vorlop, K.-D. (1999). Controlled Release of *Hirsutella rhossiliensis* from hollow beads for biological control of phytopathogenic nematodes (Poster). 26<sup>th</sup> International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, 20.-25. Juni 1999, Boston, Massachusetts, USA.
- Rose, T. und Vorlop, K.-D. (1999). Different formulation methods for microbial inoculants for use in biological control (Vortrag). International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (IOBC): Workshop „Tri-Trophic Interactions in the Rhizosphere and Root-Health Nematode-fungal-bacterial Interrelationships“, 03.-05. November 1999, Bad Honnef, IOBC/WPRS Bulletin, im Druck.
- Thielking, H., Koch, W., Gutberlet, V., Müller, J., Rose, T. und Vorlop, K.-D. (1999). Microcapsules for Biological Pest Control (Poster). 6<sup>th</sup> Symposium on Renewable Resources and 4<sup>th</sup> European Symposium on Industrial Crops and Products, 23.-25. März 1999, Bonn, Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“ Band 14, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster, 488.
- Vorlop, K.-D., Rose, T. und Patel, A. V. (1999). Encapsulation Technology (Vortrag). COST 830: Microbial Inoculants in Agriculture and Environment, Work Group 2: Formulation of microbial inoculants, 05.-06. Februar 1999, Braunschweig.
- Gutberlet, V., Müller, J., Rose, T., Vorlop, K.-D. und Thielking, H. (2000). Die Wirkung von Maiskleber als Bodenzusatz auf pflanzenparasitäre Nematoden. 28. Tagung des Arbeitskreises Nematologie der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, 01.-02. März 2000, Veitshöchheim. Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft 30, 3, 39.

Gutberlet, V., Müller, J., Rose, T., Vorlop, K.-D., Thielking, H. und Sikora, R. A. (2000). Versuche zur Nutzung nachwachsender Rohstoffe für die biologische Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden. 52. Deutsche Pflanzenschutztagung, 09.–12. Oktober 2000, Freising-Weihenstephan. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 376, 301.

Patel, A. V., Rose, T. und Vorlop, K. D. (2000). Formulation of a nematophagous fungus in a new type of hollow beads and in sugarbeet pills (Poster). The World Congress on Biotechnology, 03.-08. September 2000, Berlin.

Patel, A. V., Rose, T. und Vorlop, K. D. (2000) Formulierung von *Hirsutella rhossiliensis* in einem neuen Hohlkugeltyp und in Zuckerrübenpillen (Poster). 52. Deutsche Pflanzenschutztagung, 09. - 12. Oktober 2000, Freising-Weihenstephan. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 376, 585.

### **Sonstige Veröffentlichungen:**

Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (2000). Kapselsysteme auf Basis nachwachsender Rohstoffe zur biologischen Schädlingsbekämpfung. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V., Hofplatz 1, D – 18276 Gülzow (Hrsg.). Forschungsprojekt-Abschlußbericht, Förderkennzeichen 96NR177-F, 96NR187-F, 96NR188-F.

**Abkürzungen und Symbole**

A <sub>1</sub>	Ausgangswert der Regressionskurve
A <sub>2</sub>	Endwert der Regressionskurve
AG	Aktiengesellschaft
Aid	Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten e. V.
Bar	Bar (10 <sup>5</sup> Pa)
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
BFM	Biofeuchtmasse
BH	Bäckerhefe
<i>B. t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BTM	Biotrockenmasse
C	Celsius
c	Konzentration
ca.	circa
cm	Zentimeter (10 <sup>-2</sup> m)
CMC	Carboxymethylcellulose
COST	Coopération européenne dans le domaine de la recherche scientifique et technique / Europäische Zusammenarbeit auf dem Gebiet der wissenschaftlichen und technischen Forschung
CS	Cellulosesulfat
d	Durchmesser
d	Tag(e)
deion.	deionisiert, vollentsalzt (Reistleitfähigkeit < 5 µS)
d. h.	das heißt
DM	Deutsche Mark
dx	Zeitkonstante
dS/dt	Differential der Substratkonzentration
dx/dt	Differential der Zellmasse X
EU	Europäische Union
e. V.	eingetragener Verein
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
FAO	Food and Agriculture Organisation
g	Gramm (10 <sup>-3</sup> kg)
Gl.	Gleichung
Glu	(Natrium-)Glutamat
Gluc	Glucose
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GN	Glucose-Nutrient-

GNA	Glucose-Nutrient-Agar
G <sub>n</sub>	Gewicht im nassen Zustand nach Zentrifugieren
G <sub>t</sub>	Gewicht im trockenen Zustand
h	Höhe
h	Stunde (hour)
ha	Hektar (10.000 m <sup>2</sup> )
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochauflösende Flüssigchromatographie)
Hrsg.	Herausgeber
i. a.	im allgemeinen
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IOBC	International Organisation for Biological Control
ISO	International Organisation for Standardisation (Internationale Organisation für Normierungen)
J1 bis J4	Larvenstadien in der Entwicklung von <i>Heterodera schachtii</i>
kg	Kilogramm
KSt	Kartoffelstärke
l	Liter (10 <sup>-3</sup> m <sup>3</sup> )
ln	natürlicher Logarithmus
Lsg.	Lösung
M	Molar, mol/l; Molekulargewicht (g/mol)
m	Meter
m	Masse (mg, 10 <sup>-6</sup> kg), (g, 10 <sup>-3</sup> kg)
max.	maximal, maximale
mbar	Millibar (10 <sup>-3</sup> bar, 10 <sup>-2</sup> Pa)
mbH	mit beschränkter Haftung
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure, C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S; MES-NaOH-Puffer
mg	Milligramm (10 <sup>-6</sup> kg)
mm	Millimeter (10 <sup>-3</sup> m)
min	Minute
ml	Milliliter (10 <sup>-6</sup> m <sup>3</sup> )
mol	Stoffmenge
n	Anzahl der Meßwerte
NMR	Nuclear Magnetic Resonance-/Kernresonanz-Spektroskopie
Nr.	Nummer
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
Pa	Pascal
PC	Personal Computer
PDADMAC	Poly(diallyldimethylammoniumchlorid)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration

pK <sub>s</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante der Säure
ppb	Parts per billion (10 <sup>-9</sup> )
ppm	Parts per million (10 <sup>-6</sup> , mg/kg, µl/l)
PVAL	Poly(vinylalkohol)
q <sub>s</sub>	spezifische Substrataufnahmerate in h <sup>-1</sup>
Q <sub>s</sub>	Substrataufnahmerate (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
RI	Refractive Index (Brechungsindex)
S	Siemens (Leitfähigkeit)
S	Substrataufnahme
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SEC	Sulfoethylcellulose
s. o.	siehe oben
St	Stärke
s. u.	siehe unten
T	Temperatur
t	Zeit (s, d)
t <sub>D</sub>	Verdopplungszeit (h)
t <sub>gesamt</sub>	Fermentationsdauer (h)
TS	Trockensubstanz
u. a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV/VIS	Spektroskopie im ultravioletten- und sichtbaren Bereich
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
vgl.	vergleiche
V/VM	Volumenstrom der Fermenterzuluft in l/min bezogen auf das Arbeitsvolumen in l
w	Gewicht (weight)
WRV	Wasserrückhaltevermögen
X	Zellmasse, Ertrag (g·l <sup>-1</sup> )
x	Meßwert
x <sub>0</sub>	x-Koordinate des Wendepunkts der Regressionskurve
X <sub>0</sub>	anfängliche Zellmasse
X <sub>Ende</sub>	Zellmasse am Ende der Fermentation
X <sub>max</sub>	maximale Zellmasse
Y	Ertragskoeffizient (yield)
YE	Yeast Extract/Hefeextrakt
z. B.	zum Beispiel
σ	Standardabweichung

$\mu$	spezifische Wachstumsrate ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu\text{l}$	Mikroliter ( $10^{-6} \text{ l}$ )
$\mu\text{m}$	Mikrometer ( $10^{-6} \text{ m}$ )
$\mu_{\text{max}}$	maximale spezifische Wachstumsrate ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu\text{S}$	Mikrosiemens (Leitfähigkeit, $10^{-6} \text{ S}$ , $1 \text{ S} = 1 \Omega^{-1}$ )
$\Omega$	Ohm (elektrischer Widerstand, $1 \Omega = 1 \text{ S}^{-1}$ )
§	Paragraph
%	Prozent
%	Gewichtsprozent (w/w)
<	kleiner als
>	größer als
$\varnothing$	Durchmesser (mm, $10^{-3} \text{ m}$ )
®	eingetragenes Warenzeichen

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Veröffentlichungen	III
Abkürzungen	VII
Inhalt	XI
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	4
3 Stand des Wissens	5
3. 1 Immobilisierung und Verkapselung	5
3. 2 Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexe	10
3. 2. 1 Definition	10
3. 2. 2 Bildung	11
3. 2. 3 Struktur	13
3. 2. 4 Eigenschaften	14
3. 2. 5 Membranen und Kapseln	14
3. 2. 6 Einsatzmöglichkeiten	16
3. 2. 7 Verwendete Polyelektrolyte	18
3. 2. 7. 1 Sulfoethylcellulose	18
3. 2. 7. 2 Polydiallyldimethylammoniumchlorid	20
3. 2. 7. 3 Chitosan	21
3. 3 Nematodenprobleme an Kulturpflanzen	22
3. 4 Nematodenprobleme an Zuckerrüben	24
3. 5 Der Zystennematode <i>Heterodera schachtii</i>	27
3. 6 Möglichkeiten zur Nematodenbekämpfung	30
3. 6. 1 Chemische Bekämpfung	30
3. 6. 2 Kulturtechnische Maßnahmen	33
3. 6. 3 Nematodenresistente Kulturpflanzen	34
3. 6. 4 Biologische Nematodenbekämpfung	36
3. 6. 4. 1 Biologische Schädlingsbekämpfung	36
3. 6. 4. 2 Nematophage Pilze	37
3. 6. 4. 3 Einsatz von Pilzen zur Nematodenbekämpfung	41
3. 7 Der nematophage Pilz <i>Hirsutella rhossiliensis</i>	42
3. 8 Trocknung und Konservierung von Mikroorganismen	46
	XI

4	Material und Methoden	48
4. 1	Verwendete Materialien	48
4. 1. 1	Sulfoethylcellulose (SEC)	48
4. 1. 2	Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC)	49
4. 1. 3	Chitosan	50
4. 2	Optimierung der mechanischen Stabilität der Kapseln	52
4. 3	Messung der mechanischen Kapselstabilität	53
4. 4	Anzucht von <i>Hirsutella rhossiliensis</i>	55
4. 4. 1	Isolierung und Stammhaltung	55
4. 4. 2	Bestimmung der Wachstumsparameter	56
4. 4. 3	Medienoptimierung	57
4. 4. 4	Anzucht in Schüttelkultur	58
4. 5	Fermentation von <i>Hirsutella rhossiliensis</i>	61
4. 5. 1	Aufbau und Vorbereitung	61
4. 5. 2	Fermentation	64
4. 5. 3	Berechnungen	65
4. 5. 4	Analytik	69
4. 5. 4. 1	Glucosebestimmung mittels HPLC	69
4. 5. 4. 2	Glucosebestimmung mittels Blutzuckerschnelltest	70
4. 5. 4. 3	Biofeucht- und Biotrockenmassebestimmung	70
4. 5. 4. 4	Siebanalyse der Biomasse	71
4. 5. 4. 5	pH- und Temperaturmessung	71
4. 6	Verkapselung	73
4. 6. 1	Kapselherstellung für Auswachsversuche	73
4. 6. 1. 1	Kapseln aus SEC und PDADMAC	73
4. 6. 1. 2	Calciumalginatvollkugeln	75
4. 6. 2	Kapselherstellung für Pathogenitätstests	76
4. 7	Trocknung der Kapseln	78
4. 8	Auswachsversuche	79
4. 9	Bestimmung der gebildeten Sporen	80
4. 10	Pathogenitätstests	81
5	Ergebnisse und Diskussion	82
5. 1	Optimierung der mechanischen Stabilität der Hohlkugeln	82
5. 1. 1	Kapseln aus SEC und PDADMAC	83
5. 1. 1. 1	Konzentrationscreening	85
5. 1. 1. 2	Einfluß der Lagerungslösung	86
5. 1. 1. 3	Variation der Kapselgröße	89
5. 1. 1. 4	Weitere Charakterisierung	90



---

5. 1. 2	Kapseln aus SEC und Chitosan	90
5. 1. 2. 1	Konzentrationscreening	91
5. 1. 2. 2	pH-Screening	92
5. 2	Optimierung der Anzucht von <i>Hirsutella rhossiliensis</i>	94
5. 2. 1	Wachstumsparameter	94
5. 2. 2	Medienoptimierung	97
5. 2. 3	Anzucht im Schüttelkolben	101
5. 3	Fermentation von <i>Hirsutella rhossiliensis</i>	105
5. 3. 1	Bestimmung der spezifischen Glucoseaufnahme- und der Wachstumsrate	105
5. 3. 2	Herstellung von fein dispersem Pilzmyzel	108
5. 4	Optimierung von Auswachsen und Sporulation des Pilzes aus den Kapseln	111
5. 4. 1	Kapseln aus SEC und PDADMAC	112
5. 4. 1. 1	Biomassegehalt	112
5. 4. 1. 2	Wachstumsmedium	113
5. 4. 1. 3	Sporulation	118
5. 4. 1. 4	Trocknung und Lagerung	121
5. 4. 2	Vergleich mit Calciumalginatvollkugeln	124
5. 5	Pathogenitätstests	126
6	Zusammenfassung	128
7	Anhang	136
7. 1	Literaturverzeichnis	136
7. 2	Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	162
7. 3	Verwendete Geräte	163

Danksagung

Lebenslauf



## 1 Einleitung

Durch das allgemein gestiegene Umweltbewußtsein gewinnt die biologische Schädlingsbekämpfung als Teil des integrierten Pflanzenschutzes immer stärker an Bedeutung. Dabei stoßen auch Schädlingsbekämpfungsmethoden immer mehr auf Interesse, bei denen die Schädlinge mittels ihrer natürlichen Antagonisten bekämpft werden. In der Vergangenheit wurden zwar viele solcher Antagonisten wirtschaftlich relevanter Schädlinge gefunden und intensiv untersucht, ihr direkter Einsatz gegen die Schädlinge blieb jedoch meist ohne Erfolg. Immer wieder traten unüberwindbare Probleme bei der Anzucht im großen Maßstab und der Applikation der Antagonisten auf.

Phytopathogene Nematoden sind die am weitesten verbreiteten Schädlinge in der Landwirtschaft, im Gartenbau, der Forstwirtschaft, dem Zierpflanzenbau und dem Weinbau. Immer wieder kommt es zu verheerenden wirtschaftlichen Schäden an Kulturpflanzen.

Die früher übliche chemische Nematodenbekämpfung war mit hohen Kosten und hohem Aufwand bei häufig zweifelhaftem Erfolg verbunden. Die meisten Nematizide sind heute aufgrund ihrer umweltfeindlichen Wirkstoffe verboten oder unterliegen starken Einschränkungen in der Anwendung. Die Entwicklung und Zulassung neuer Nematizide ist aufgrund der umfangreichen Anforderungen an chemische Pflanzenschutzmittel sehr zeit- und kostenintensiv und scheint daher eher fraglich.

Der Anbau vom Nematodenbefall betroffener Kulturpflanzen in einer weiten Fruchtfolge läßt sich in der Praxis aufgrund technischer, arbeitswirtschaftlicher, markt- und betriebswirtschaftlicher Gegebenheiten selten einhalten.

Bei manchen Kulturpflanzen stehen zwar bereits nematodenresistente Sorten zur Verfügung, die entweder durch klassisches Einkreuzen der Resistenzgene oder durch gentechnischen Methoden erhalten wurden, jedoch sind bei einem intensiven Anbau dieser Sorten schon erste Resistenzen und Probleme mit gleichzeitig eingekreuzten negativen Eigenschaften aufgetreten. Zusätzlich finden gentechnisch veränderte Pflanzen wie der chemische Pflanzenschutz eine zunehmend geringere gesellschaftliche Akzeptanz.

Bereits 1888 beschrieb der deutsche Botaniker Wilhelm Zopf das Fangen von Nematoden durch einen Pilz, der zu diesem Zweck netzartige Schlingen im Boden ausbildet. Obwohl anfangs als wissenschaftliche Kuriosität abgetan, hat man schon früh

Versuche unternommen, diese Pilze gezielt zur Bekämpfung von Nematoden einzusetzen.

Trotz der Tatsache, daß bis heute kaum wirksame Präparate entwickelt werden konnten, wird die potentielle Möglichkeit eines Einsatzes der nematophagen Pilze immer wieder herausgestellt.

Probleme ergaben sich in der Vergangenheit immer wieder bereits bei der Anzucht der nematophagen Pilze im großen Maßstab, da die wirksamsten Organismen auch in der Regel die schlechtesten Saprophyten sind und daher nur schwer außerhalb der Nematoden vermehrt werden können.

Der nematophage Pilz *Hirsutella rhossiliensis* verbindet eine gute Pathogenität mit hinreichenden saprophytischen Eigenschaften. Sein sehr einfacher Lebenszyklus ist nur auf das Parasitieren von Nematoden ausgerichtet. In dieser Arbeit werden Möglichkeiten zur biologischen Bekämpfung des Zuckerrübenneematoden *Heterodera schachtii* mit *H. rhossiliensis* untersucht.

Da der Einsatz freier Organismen in der Regel nicht erfolgreich ist und häufig in der landwirtschaftlichen Praxis nicht durchgeführt werden kann, soll durch eine Formulierung bzw. Verkapselung der Pilz vor biotischen und abiotischen Einflüssen geschützt werden. Die Formulierung soll darüber hinaus auch eine kontrollierte Freisetzung, die Lagerung und die einfache Ausbringung der Organismen ermöglichen.

In der Biotechnologie werden schon seit langer Zeit Enzyme oder ganze Zellen immobilisiert. Eine besondere Form der Immobilisierung stellt der Einschluß bzw. die Verkapselung von biologischem Nutzmaterial in verschiedenen Polymermatrices dar.

Am häufigsten wird zur Immobilisierung das natürliche Polymer Alginat verwendet. Da es für einen großflächigen Einsatz in der Landwirtschaft sehr teuer ist, als Nahrungsquelle das Wachstum unerwünschter Mikroorganismen fördern und das Wurzelwachstum negativ beeinflussen kann, sind andere Alternativen wünschenswert.

Besonders interessant zur Verkapselung von empfindlichem biologischem Material sind Hohlkugeln, da die Struktur von Biomolekülen aufgrund ihres flüssigen, wäßrigen Kerns nur wenig beeinflusst wird. Hohlkugeln haben sich daneben auch zur Verkapselung ganzer Zellen bewährt.

Besonders elegant können Hohlkugeln auf Basis von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen hergestellt werden. Für ihren Einsatz in der Praxis sollten neben der Bio-

kompatibilität und eventuell der Sterilisierbarkeit der Kapselmaterialien auch deren einfache und preiswerte Herstellung in konstanter Produktqualität und eine gute Modifizierbarkeit gewährleistet sein.

Eine große Zahl möglicher Materialien wurde in der Vergangenheit bereits auf die Eignung zur Mikroverkapselung hin untersucht. Zur Herstellung von Hohlkugeln gilt dabei Cellulosederivaten ein besonderes Interesse. In der Vergangenheit wurde Natrium-Cellulosesulfat intensiv untersucht, jedoch traten immer wieder Probleme mit der reproduzierbaren Herstellung auf.

Mit Sulfoethylcellulose (SEC) steht ein anderes interessantes Cellulosederivat zur Verfügung, das sich problemlos auch im technischen Maßstab in gleichbleibender Qualität herstellen läßt.

## 2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung mechanisch stabiler Hohlkugeln auf Basis von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen unter Verwendung von Sulfoethylcellulose (SEC) als Polyanion zur besonders schonenden Mikroverkapselung von Zellen, Enzymen und anderem Nutzmaterial, hier im speziellen dem nematophagen Pilz *Hirsutella rhossiliensis* zur biologischen Bekämpfung des Zuckerrüben nematoden *Heterodera schachtii*.

Aus einer Vorauswahl verschiedener im Technikumsmaßstab hergestellter SEC-Präparate und technischer Polykationen sollten geeignete Polymere ausgewählt werden und wichtige Faktoren für die Bildung mechanisch stabiler Hohlkugeln aus diesen Produkten ermittelt werden.

Für einen großflächigen Einsatz von verkapseltem *H. rhossiliensis* zur biologischen Schädlingsbekämpfung ist eine Pilzanzucht in großem Maßstab unter Verwendung eines preiswerten Mediums erforderlich, die vorzugsweise im Fermenter erfolgt. Dazu sollten vorab grundlegende Wachstumsansprüche ermittelt werden, da sie von dem in dieser Arbeit verwendeten Isolat bisher nicht bekannt waren.

Da *H. rhossiliensis*, wie viele andere Pilze auch, während der Kultivierung in flüssigen Medien unerwünschte Pellets bildet, sollte eine Anzuchtmethode entwickelt werden, bei der das Pelletwachstum unterdrückt und möglichst fein disperse Biomasse gebildet wird.

Der angezogene Pilz sollte in den optimierten Hohlkugeln formuliert werden, wobei mit möglichst wenig verkapseltem Pilz ein schnelles und weitreichendes Auswachsen erreicht werden sollte. Zur Optimierung des Pilzwachstums innerhalb der Hohlkugeln, die wie ein Mikrofermenter wirken, und des Auswachsverhaltens waren entsprechende Medienzusätze zu den Kapseln zu untersuchen. Daneben sollten Möglichkeiten zur Steigerung der Wirksamkeit des Pilzes gefunden und Arbeiten zur Trocknung und Lagerung der Pilzkapseln durchgeführt werden.

Weiterhin sollten von den optimierten Kapseln entsprechende Mengen für Pathogenitätstests gegenüber dem Zuckerrüben nematoden *H. schachtii* am Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde Münster der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) bereitgestellt werden.

### 3. Stand des Wissens

#### 3. 1 Immobilisierung und Verkapselung

Unter Immobilisierung wird die Fixierung von Enzymen, Zellen, oder Wirkstoffen an oder in Trägermaterialien verstanden, wobei deren Funktionen weitgehend erhalten bleiben (Klein und Vorlop 1985; Hartmeier 1986; Falbe und Regitz 1995).

Mit der Essigherstellung durch Berieselung von an Holzspänen anhaftenden Essigsäurebakterien mit alkoholhaltigen Lösungen wurden um 1820 Immobilisierungstechniken bereits angewendet, bevor sie als solche überhaupt bekannt waren. Erste Hinweise auf die Immobilisierung von Enzymen finden sich 1916 und 1948 in der Literatur. 1916 beschrieben Nelson und Griffin an Aktivkohle und Aluminiumoxid adsorbierte Invertase. Zwar folgten in den 50er Jahren weitere Veröffentlichungen, zu einem sprunghaften Anstieg der Aktivitäten kam es jedoch erst in den 60er Jahren, die basierend auf den Arbeiten von Chibata mit der ersten industriellen Anwendung, der Herstellung von L-Aminosäuren, im Jahr 1969 ihren ersten Höhepunkt fanden (Tanabe Seiyaku Company, Japan; Klein und Vorlop 1985; Hartmeier 1986; Shibata 1996; Wandrey 1996). Es folgte die Immobilisierung ganzer Zellen, wobei zunächst Anwendungen wie die Ethanolproduktion mittels Hefe oder der Einschluß von Langerhansschen Inseln zur Behandlung von Diabetes im Vordergrund standen (Buchholz und Kasche 1997; Kühtreiber *et al.* 1999). 1980 gelang es Lim und Sun durch Einschluß in kleine Kapseln die Langerhansschen Inseln in einen anderen Organismus zu überführen, ohne daß das Immunsystem sie sofort bekämpft. Bis heute haben verkapselte Substanzen, Enzyme und Zellen Anwendungen in den unterschiedlichsten Bereichen gefunden (Chibata *et al.* 1987; Wandrey 1996; Arshady 1999).

Tab. 3. 1 Vor- und Nachteile der Immobilisierung

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rückhaltung der Enzyme oder Zellen</li> <li>• Einsatz in kontinuierlichen Prozessen</li> <li>• Sicheres und einfaches Abtrennen</li> <li>• Hohe Prozeßstabilität</li> <li>• Gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeute durch Wachstum und Anreicherung von Zellen in den Immobilisaten</li> <li>• Wiederholte Einsatzmöglichkeit</li> <li>• Unsterile Prozeßführung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immobilisierungskosten</li> <li>• Aktivitätsverlust während des Immobilisierungsvorgangs</li> <li>• Diffusionslimitierung in der Matrix</li> <li>• Abrieb im Rührreaktor</li> <li>• Druckverlust im Festbettreaktor</li> </ul>

Besonders beim Einsatz in Bioreaktoren sind immobilisierte Systeme von Vorteil (Tab. 3. 1; Vorlop und Klein 1983; Scott 1984; Vorlop 1984; Chibata *et al.* 1986, 1987; Hartmeier 1986; Klein und Vorlop 1986; Wiesmann 1994). Hier werden sie

z. B. großtechnisch zur Produktion von L-Aminosäuren, Antibiotika, Alkoholen oder organischen Säuren genutzt (Chibata *et. al.* 1987). Im Lebensmittelbereich ist ein Verfahren etabliert, bei dem mit Hilfe von in Calciumalginatkugeln immobilisierten Zellen des Bakteriums *Protaminobacter rubrum* eine enzymatische Umlagerung (Transglucosidierung) von Saccharose zu Isomaltulose (Palatinose) erfolgt, die in einem zweiten Schritt zu Isomalt® (Palatinit) hydriert wird (Weidenhagen und Lorenz 1957; Schiweck *et al.* 1991; Schiweck und Munir 1992). Die Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurt stellt zur Zeit 35.000 Tonnen des Zuckeraustauschstoffes Isomalt® im Jahr her (Kunz 2000).

Im Vergleich zu freien Enzymen und Zellen wird bei immobilisierten Systemen der Stoffumsatz nicht nur von den katalytischen Eigenschaften, sondern auch vom Transport der Edukte und Produkte durch die Immobilisierungsmatrix bestimmt. Die Raum-Zeit-Ausbeute, d. h. der Stoffumsatz pro Zeiteinheit und Reaktorvolumeneinheit, wird als direkte Funktion der Katalysatordichte von der maximal pro Zeiteinheit transportierbaren Stoffmenge und der maximal realisierbaren Katalysatordichte begrenzt. Weitere wichtige Charakteristika immobilisierter Biokatalysatoren neben den katalytischen Eigenschaften sind z. B. der Partikeldurchmesser, das Quellverhalten im verwendeten Reaktionsmedium oder der Druckabfall in Festbettreaktoren (Buchholz und Kasche 1997).

In der biologischen Schädlingsbekämpfung kann durch Verkapselung neben dem Schutz des Nutzmaterials gegenüber biotischen und abiotischen Einflüssen auch dessen kontrollierte Freisetzung realisiert werden. Eine Verkapselung bzw. Formulierung ist hier besonders wichtig, da der Einsatz der freien Organismen in der Regel nicht erfolgreich ist (Stirling 1991; Siddiqui und Mahmood 1996; Patel 1998). Die Formulierung soll darüber hinaus auch die Lagerung und die einfache Ausbringung der Organismen ermöglichen (Stirling 1988 a, 1991; Stirling und Mani 1995).

Eine Immobilisierung kann entweder durch Bindung an einen Träger oder durch Einschluß in eine Matrix oder Membran erfolgen (Vorlop und Klein 1983; Klein und Vorlop 1985; Hartmeier 1986; Chibata *et. al.* 1987; Falbe und Regitz 1995; Dulieu *et. al.* 1999).

Die Fixierung an Träger ist durch schwache physikalische Kräfte (Adsorption), durch eine kovalente oder ionische Bindung oder durch Verknüpfung des zu immobilisierenden Materials mit bi- oder multifunktionellen Reagenzien (z. B. Glutardialdehyd, Diisocyanate) möglich (Vorlop und Klein 1983). Als Träger sind anorganische (z. B. poröses Glas, Keramik, Metalloxide, Bentonit), organische natürliche (z. B. Agarose, Sepharose, Cellulose) oder synthetische (z. B. Acrylat, Nylon, Polystyrol, Polyethy-



len, Polyurethan) Materialien geeignet. Entscheidend für die Auswahl sind u. a. eine große Oberfläche, die Struktur und die Verträglichkeit mit dem biologischen Material. Bei der Matriceinhüllung werden die Zellen oder Enzyme in natürliche oder synthetische Polymere eingebettet. Die äußere Gestalt kann dabei sehr unterschiedlich sein. Möglich sind z. B. Kugeln, Zylinder, Würfel, Fasern oder Folien (Hartmeier 1986).

Die Herstellungsmethode und der Mechanismus der Matrixbildung sind abhängig vom verwendeten Material (Klein und Vorlop 1985; Hartmeier 1986). Dabei gibt es keine universell anwendbare Immobilisierungsmethode. Es ist vielmehr erforderlich, aus der Fülle der Materialien und Methoden die geeignetste herauszusuchen und entsprechend anzupassen.

Eine sehr einfache Methode stellt die Kältegelierung dar, bei der Polymere wie z. B. Agar oder Gelatine Verwendung finden. Die Materialien werden durch Erwärmen auf höhere Temperaturen verflüssigt. Da sie beim Abkühlen erst wieder bei Temperaturen zwischen 30 und 40 °C fest werden, ist die Möglichkeit gegeben, vorher Zellen o. ä. unterzumischen und die Suspension in die gewünschte Form zu bringen. Von Nachteil sind die kurzzeitig auftretenden höheren Temperaturen.

Besser geeignet sind Polyvinylalkohol-Hydrogele. Durch Auftropfen einer Suspension aus gelöstem Polyvinylalkohol und dem biologischen Nutzmaterial auf eine feste Oberfläche mit anschließender gezielter Trocknung und Gelierung bei Raumtemperatur entstehen hochelastische und mechanisch sehr stabile linsenförmige Immobilisate (LentiKats<sup>®</sup>, Jekel *et al.* 1998).

Weniger geeignet sind Verfahren, bei denen die Polymermatrix durch Lösungsmittelfällung (z. B. Cellulosetriacetat, Polyurethane), Polykondensation (z. B. Epoxidharze, Polyurethane) oder Polymerisation (z. B. Polyacrylamid, Polymethacrylamid) gebildet wird, da hier das empfindliche biologische Material häufig harten nicht physiologischen Bedingungen, giftigen Monomeren, Radikalen oder Lösungsmitteln ausgesetzt ist (Hartmeier 1986). In einigen Fällen kann die Toxizität des Verkapselungsverfahrens durch den Einsatz von Prepolymeren vermindert werden. Polyurethan-Hydrogele können z. B. durch Vernetzung von Polycarbamoylsulfonat-Prepolymeren hergestellt werden, die weniger toxisch sind (Vorlop *et al.* 1992; Muscat *et al.* 1996).

Besonders verbreitet ist die Immobilisierung auf Basis der ionotropen Gelbildung. Die ionotrope Gelbildung wurde bereits sehr früh intensiv untersucht (Thiele und Micke 1948; Thiele 1949; Thiele und Micke 1950; Deuel und Solms 1951; Thiele 1954; Thiele und Andersen 1955 a, b; Thiele und Hallich 1957, 1958; Thiele 1963; Thiele *et al.* 1963; Thiele und Cordes 1966; Thiele 1967; Lim und Sun 1980; Smidsrød und Skjak-Bræk 1990; Thu *et al.* 1996). Bei der ionotropen Gelbildung werden wasserlösliche anionische oder kationische Polyelektrolyte durch Eintropfen in die Lösung mehrwertiger Kationen bzw. Anionen vernetzt. Bei den Polyanionen finden Polysaccharide mit Carboxyl- (z. B. Alginat, Pektin, Carboxymethylcellulose), Phospho- (z. B. Phospho-Guargum), Sulfonsäure- (z. B. Carrageenan, Furcellaran) oder Sulfatgrup-

pen (z. B. Cellulosesulfat), bei den Polykationen Polymere mit Aminogruppen (z. B. Chitosan) besonders häufig Verwendung. Als Gegenionen sind Calcium- oder Kaliumionen bzw. Polyphosphate gut geeignet. Nachteilig bei den auf der ionotropen Gelbildung beruhenden Matrices ist nur, daß sie sich beim Vorhandensein bestimmter Ionen (z. B. Phosphat, Citrat), Komplexbildner oder bei bestimmten pH-Werten wieder auflösen. Dies kann z. B. bei Calciumalginatkugeln bei einem Überschuß von Natriumionen geschehen (Vorlop und Klein 1983; Hartmeier 1986).

Eine für die Immobilisierung geeignete Matrix kann aber auch gebildet werden, wenn es sich sowohl bei der anionischen als auch bei der kationischen Komponente um einen Polyelektrolyten handelt. Diese so gebildeten Symplexe ermöglichen u. a. die Herstellung von Hohlkugeln mit einem flüssigen Kern, die interessante Eigenschaften aufweisen (s. 3. 2. 5).

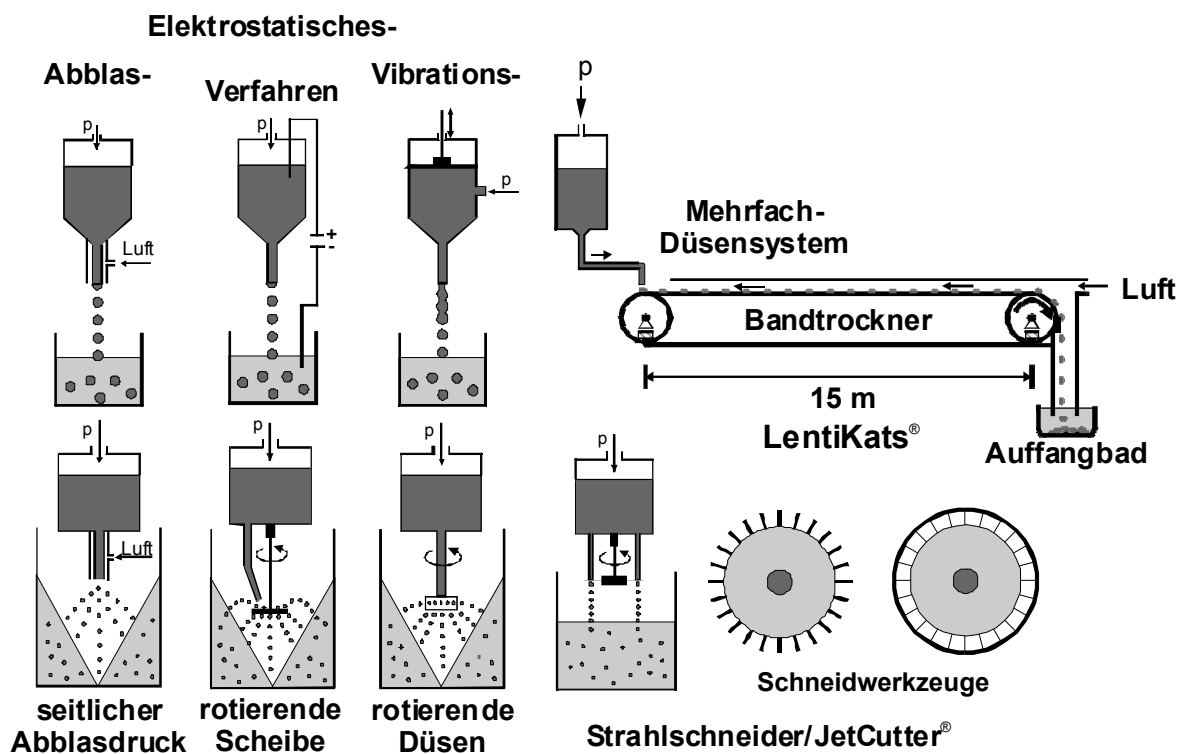


Abb. 3. 1 Immobilisierungsmethoden im größeren Maßstab (verändert nach Vorlop und Klein 1983; Muscat *et al.* 1996; Jekel *et al.* 1998; Prüße *et al.* 1998 a, 1998 b; Prüße 1999).

Im kleinen Maßstab im Labor lassen sich Immobilisate sehr einfach z. B. durch Eintropfen mit einer Spritze herstellen. Für die Produktion größerer Mengen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung (Abb. 3. 1; Muscat *et al.* 1996; Poncelet und Neufeld 1996; Dulieu *et al.* 1999; Prüße *et al.* 1998 a, 1998 b; Prüße 1999; Senuma *et al.* 2000). Das Eintropfen der Polymerlösung in die Vernetzerlösung erfolgt in der Regel durch Druck auf den Vorratsbehälter und Zerteilen des Fluidstroms in einzelne

Tröpfchen. Zum Zerteilen und zur Variation der Tröpfchengröße gibt es verschiedene Möglichkeiten. Beim Abblasverfahren werden die Tröpfchen durch Anlegen eines konzentrischen Luftstroms um die Düse abgerissen. Andere Verfahren nutzen elektrostatische Kräfte oder Vibrationen. Daneben gibt es auch rotierende Scheiben oder Düsen, die Tröpfchen erzeugen und in die Vernetzerlösung schleudern. Kugeln besonders einheitlicher Größe liefert der Strahlschneider, bei dem ein aus einer oder mehreren Düsen austretender Strahl durch einen rotierenden Strahlteiler zerschnitten wird. Mit dem Strahlschneider lassen sich bei sehr enger Größenverteilung hohe Durchsätze erreichen und auch sehr kleine Kugeln von nur 100 µm Durchmesser herstellen (Prüße *et al.* 1998 a, 1998 b; Prüße 1999). Eine kontinuierliche Produktion der linsenförmigen LentiKats® ist durch Auftropfen einer Suspension aus gelöstem Polyvinylalkohol und dem biologischen Nutzmaterial auf ein Förderband mit anschließender Trocknung und Gelierung möglich (Jekel *et al.* 1998).

Zur Formulierung von Organismen in der biologischen Schädlingsbekämpfung (s. 3. 6. 4. 1) werden für getrocknete Produkte häufig auch Methoden der klassischen mechanischen Verfahrenstechnik angewendet wie z. B. das Agglomerieren, bei dem kleine Partikel zu größeren Einheiten (z. B. Granulaten oder Pellets) zusammengefügt werden (Schubert 1986; Jones und Burges 1998). Durch Agglomerieren kann neben einer leichteren Verarbeitung, Handhabung und Dosierung auch eine Verringerung der Risiken für den Anwender durch feine Stäube der biologisch aktiven Produkte erzielt werden. Spezielle Formulierungen können das Anhaften der aktiven Komponente an Pflanzenteilen oder dessen kontrollierte Freisetzung ermöglichen. Der Anteil der biologisch aktiven Komponente liegt in der Regel zwischen 5 und 20 % (w/w). Agglomerierungen können z. B. mit Granuliertellermaschinen, Granuliertrommeln oder in Wirbelschichtgranulierern durchgeführt werden. Dabei werden Zell- oder Sporensuspensionen (teilweise mit viskosen Bindemitteln vermischt) mit Trägermaterialien zu Pulvern, Granulaten oder Pellets zusammengefügt. Als Träger können anorganische oder organische Materialien verwendet werden (s. o.), wobei mineralische Substanzen wie z. B. Lehm oder Kaolin besonders geeignet sind, da sie Feuchtigkeit binden können und so den Zellen oder Sporen eine gewisse Restfeuchte garantieren, die ihre Überlebensrate erhöht (Heijnen *et al.* 1992). Bei Burges (1998) finden sich diverse zur Formulierung von Mikroorganismen geeignete Materialien.

### 3.2 Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexe

#### 3.2.1 Definition

Bereits 1934 beschäftigten sich Willstätter und Rhodewald mit der Komplexbildung von Biopolymeren durch elektrostatische Bindungen. Weitere Arbeiten über derartige Flockungsreaktionen folgten 1949 von Bugenberg de Jong und Fuoss & Sadek und 1951 von Deul & Solms.

Eine erste systematische Beschreibung dieser Flockungsreaktion eines Ions mit einem Gegenion findet sich bei Deul *et al.* 1953, die Niederschlagsbildungen bei der Reaktion polymerer Säuren mit polymeren Basen intensiv untersucht haben.

Zur Erklärung der verschiedenen Polyelektrolyt-Reaktionen werden drei Ionen-Typen nach Ladung, Größe und Form unterschieden (Abb. 3. 2).

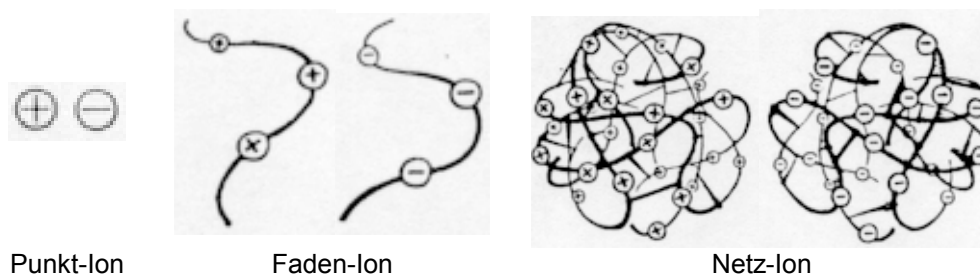


Abb. 3. 2 Verschiedene Ionen-Typen (nach Deul *et al.* 1953).

Punkt-Ionen entsprechen dabei kleinen, niedervalenten Ionen, Faden- und Netz-Ionen großen, polyvalenten fadenförmigen bzw. dreidimensional vernetzten Ionen. Daneben existieren alle denkbaren Übergangstypen. Eine Reaktion zu einem Polyelektrolyt-Komplex findet statt, wenn mindestens ein Reaktionspartner ein Faden- oder Netz-Ion ist. Die Bindung wird auf die Wirksamkeit von Coulomb-Kräften zurückgeführt. Eine optimale Flockungsreaktion tritt ein, wenn die Polykationen die gleiche Gesamtladung wie die Polyanionen tragen, d. h. bei Reaktionen zwischen starken polymeren Säuren und starken polymeren Basen am Äquivalenzpunkt. Da bei schwachen Polyelektrolyten die Ladung pH-abhängig ist, ist auch das Flockungsoptimum pH-abhängig. pH-abhängig ist dann ebenfalls das Verhältnis von Polykation zu Polyanion im isoelektrischen Niederschlag.

Dautzenberg *et al.* (1989) definiert einen Polyelektrolyt-Komplex als einen Komplex, der aufgrund Coulombscher Wechselwirkungen aus Polyanionen und Polykationen gebildet wird. Michaels (1965) bezieht zusätzlich thermodynamische Überlegungen mit ein (s. 3. 2. 2). Xia *et al.* (1993) stellen die Ladungsneutralisierung eines Polyanions durch ein Polykation in den Vordergrund.

Bei Philipp *et al.* (1982) wird zwischen „Polyelektrolyt-Komplexen im engeren Sinne“ und „Polyelektrolyt-Komplexen im weiteren Sinne“ unterschieden. Unter „Polyelektrolyt-Komplexen im engeren Sinne“, die hier auch als Symplexe bezeichnet werden,



halten. Diese zweite Aggregation führt in den meisten der untersuchten Fälle zu einer mehr oder weniger schnellen Phasenseparation (Ausflockung).

Bei den getrennten Lösungen von Polyanion und Polykation sind die geladenen funktionellen Gruppen durch die jeweiligen Gegenionen abgeschirmt. Diese Abschirmung muß bei der Komplexbildung überwunden werden. Triebkraft der der Komplexbildung zugrundeliegenden Reaktion ist eine Entropiezunahme des gesamten Systems. Die Reaktion der beiden entgegengesetzt geladenen Polymerketten führt durch die Bildung eines neuen geordneten Systems zwar zu einer Entropieabnahme, jedoch wird diese durch die Entropiezunahme bei der Freisetzung der Gegenionen überkompensiert. Durch die Entropiezunahme bei der Gesamtreaktion ( $\Delta S > 0$ ) läuft die Bildung des Symplexes trotz eventueller sterischer Hinderung spontan ab. Ein Hinweis auf eine entropiegetriebene Reaktion ist auch die Tatsache, daß sich Polyelektrolyt-Komplexe bei erhöhter Temperatur in konzentrierten Salzlösungen auflösen. Die Bildung des Symplexes aus zwei Polymerketten ist eine endotherme Reaktion ( $\Delta H > 0$ ). Dies gilt aber nicht, wenn das Polyanion und das Polykation nicht als Salz sondern als Säure bzw. Base eingesetzt werden. Hier kommt es zu einer schnellen exothermen Reaktion, der ein langsamer Umbau des Komplexes folgt (Michaels 1965; Michaels *et al.* 1965; Philipp *et al.* 1982).

Rees und Welsh (1977) sehen in Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol- und ionischen Kräften sowie Solvationsthermen die ausschlaggebenden Wechselwirkungen, die schließlich zur Komplexbildung führen. Nach Dautzenberg *et al.* (1989, 1994) spielen Coulombsche Kräfte, van der Waals-Kräfte, Hydrophobie, Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Charge-Transfer neben der Thermodynamik (energiegetriebene Phasenseparation in ein polymerreiches Gel und ein polymerarmes Sol) eine dominierende Rolle. Vom kinetischen Standpunkt ist die Komplexbildung zwischen einem Polyanion und einem Polykation sehr schnell. Die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte sind hierbei die Diffusion bei der Symplexxgelbildung und die Neuordnungen der bereits gebildeten Symplexaggregate durch Konformationsänderungen und Loslösungen (Dautzenberg *et al.* 1994).

Für Kabanov (1992) und Schindler & Nordmeier (1994) spielen kooperative Wechselwirkungen bzw. Bindungen eine wichtige Rolle bei der Bildung der Polyelektrolyt-Komplexe.

Bis heute fehlt jedoch ein grundlegendes Verständnis über die Art der Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexbildung. Auch gibt es weder ein quantitatives mechanistisches noch ein kinetisches Modell (Dautzenberg *et al.* 1989, 1994).

### 3. 2. 3 Struktur

Die Struktur von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen wird hauptsächlich bestimmt durch die Fähigkeit der Polymerketten durch rotatorische Konformationsänderungen die geladenen funktionellen Gruppen so in Position zu bringen, daß stabile Bindungen entstehen, den weitreichenden Charakter der Coulombwechselwirkungen und den Effekt der Gegenionen, die die Elektroneutralität sichern (Michaels *et al.* 1965; Skouri *et al.* 1995).

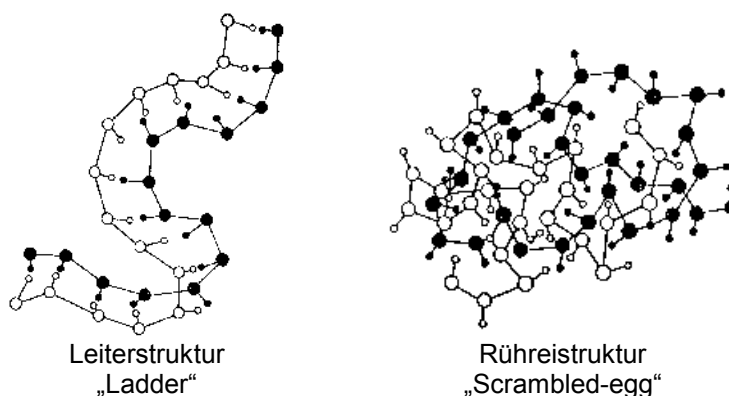


Abb. 3. 4 Grenzstrukturmodelle der Struktur von Symplexen (Michaels 1965; Philipp *et al.* 1982; Dautzenberg *et al.* 1994).

Für die Struktur von Symplexen gibt es zwei Grenzstrukturmodelle. Bei der ersten Grenzstruktur wird angenommen, daß die Polyelektrolyt-Ketten, die vor der Reaktion in einer stark gestreckten Konformation vorliegen, sich wie ein Reisverschluß zu einer „Leiterstruktur“ zusammenlagern (Abb. 3. 4, links). In der zweiten Grenzstruktur, der „Rühreistruktur“, besteht der Komplex aus völlig wahllos miteinander verbundenen Polyelektrolyt-Ketten (Abb. 3. 4, rechts). Hier sind die ionischen Gruppen innerhalb des Netzwerks mehr oder weniger homogen im Raum verteilt, wie Ionen in konzentrierten Elektrolytlösungen. Der Ladungsausgleich ist statistisch. Die reale Struktur nimmt eine Position zwischen den zwei Grenzstrukturen ein, liegt aber wesentlich näher an der Rühreistruktur (Michaels 1965; Philipp *et al.* 1982; Dautzenberg *et al.* 1994).

### 3. 2. 4      **Eigenschaften**

Polyelektrolyt-Komplexe sind kolloidchemisch betrachtet Gele, ein Zwischenzustand zwischen fest und flüssig (Thiele 1963). Unter optimalen Bedingungen erhaltene Komplexe zeigen, elektrophoretisch gemessen, keinen Ladungsüberschuß (Deuel *et al.* 1953). Die Komplexe zeigen physikalisch ein Übergangsverhalten zwischen ionischen kristallinen Feststoffen und amorphen organischen Polymeren. Die Komplexe sind homogene, transparente, amorphe Harze, im getrockneten Zustand extrem hart und brüchig und im wäßrig nassen Zustand leder- oder gummiartig. Sie sind unlöslich in üblichen Lösungsmitteln und unschmelzbar. Dünne Filme von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen zeigen ungewöhnliche Transportcharakteristika, wenn sie als Dialysemembran verwendet werden (s. 3. 2. 5 und 3. 2. 6). Einfache Elektrolyte wie Natriumchlorid diffundieren schnell durch die Membran, während Elektrolyte mit höherem Molekulargewicht, wie Methylenblauhydrochlorid, fast vollständig zurückgehalten werden (Michaels 1965).

Fällungen von Symplexen aus unterschiedlichen Polyelektrolyten zeigen in Wasser ein reproduzierbares und reversibles Quellverhalten. Die Bestimmung des im Symplex festgehaltenen Quellwassers erfolgt über das Wasserrückhaltevermögen (WRV) (Philipp *et al.* 1980):

$$WRV = \frac{(G_n - G_t) \times 100}{G_t} \% \quad (3. 1)$$

$G_n$  = Gewicht im nassen Zustand nach Zentrifugieren  
 $G_t$  = Gewicht im trockenen Zustand

Das so berechnete Wasserrückhaltevermögen kann bei Symplexen zwischen 50 und 1.000 % liegen (Philipp *et al.* 1980; Dautzenberg *et al.* 1994; Skouri *et al.* 1995). Das Quellen der Komplexe ist von der Anzahl der ionischen Gruppen, der Valenz und Natur der Gegenionen, dem pH-Wert und der Ionenstärke und Zusammensetzung des Quellungsmediums abhängig (Peppas und Khare 1993).

### 3. 2. 5      **Membranen und Kapseln**

Mit Polyelektrolyt-Komplexen können auch größere Strukturen wie Membranen oder Kapseln, speziell Hohlkugeln, aufgebaut werden.

An der Phasengrenze zwischen zwei unterschiedlich geladenen Polyelektrolyten kommt es spontan zur Ausbildung einer **Membran**, die beide Phasen voneinander trennt. Alle weiteren Polyelektrolyt-Moleküle müssen nun durch diese Primärmembran diffundieren, um an der Reaktion teilzunehmen. Da die Permeabilität der Pri-



märmembran für verschiedene Polyelektrolyte ganz unterschiedlich sein kann, werden auch der weitere Reaktionsverlauf und damit auch die weitere Strukturbildung und das Dickenwachstum des Gelfilms durch die Primärmembran beeinflusst. Morphologische Untersuchungen zeigen daher in vielen Fällen einen asymmetrischen Aufbau der Membran. Die Reaktion bzw. das Wachstum der Membran kommt zum Stillstand, wenn der Diffusionswiderstand so groß geworden ist, daß keine Polyelektrolyt-Moleküle mehr nachgeliefert werden. Bei Verwendung von Cellulosesulfat (CS) oder Carboxymethylcellulose (CMC) als Polyanion und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) als Polykation kommt es auf der Seite des Polyanions zu einer Verarmung an Polyelektrolyt. Die Membran weist in diesem Fall morphologisch in Richtung des Polyanions eine immer lockerer aufgebaute Struktur auf (Hartmann *et al.* 1987; Dautzenberg *et al.* 1994).

Die Herstellung von **Hohlkugeln** auf Basis von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen, ist aufgrund ihres flüssigen Kerns besonders interessant (Dautzenberg *et al.* 1983, 1985, 1987; Yao *et al.* 1993; Dautzenberg *et al.* 1994; Yao 1995; Dautzenberg *et al.* 1996).

Interesse fanden Hohlkugeln bereits in den 70er und 80er Jahren, besonders zur Herstellung „künstlicher Zellen“ und zur Verkapselung Langerhansscher Inseln zur Diabetesbekämpfung (s. 3. 2. 6). Die Herstellung von Hohlkugeln war anfangs noch sehr aufwendig: Zuerst mußten Calciumalginatvollkugeln hergestellt werden, die dann mit zusätzlichen Schichten aus Poly-L-Lysin und Alginat versehen wurden. Anschließend wurde der Calciumalginatkern z. B. mittels eines Phosphat- oder Citratpuffers wieder aufgelöst (Lim und Sun 1980; Lim und Moss 1981; Goosen und Sun 1985).

Einfacher und in nur einem Schritt verläuft die Verkapselung in Calciumalginathohlkugeln mit guten mechanischen Eigenschaften durch Mischen des biologischen Materials mit z. B. Methylcellulose und Calciumchlorid und anschließendem Eintropfen in eine verdünnte Natriumalginatlösung (Spiekermann *et al.* 1987).

Von Interesse zur Herstellung mechanisch stabiler Hohlkugeln in nur einem Schritt sind aber auch Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexe (Dautzenberg *et al.* 1983, 1985, 1987; Yao *et al.* 1993; Wiesmann 1994; Dautzenberg *et al.* 1994; Yao 1995; Dautzenberg *et al.* 1996).

Hohlkugeln entstehen z. B. durch Eintropfen einer Lösung eines Polyanions (z. B. CS) in die Lösung eines Polykations (z. B. PDADMAC). Sofort nach Kontakt des CS-Tropfens mit der Vernetzerlösung bildet sich die Primärmembran. Die Kapselmembran wächst nun so lange weiter nach innen, bis es zu einer Verarmung an CS im Innern kommt, oder bis der Diffusionswiderstand so groß geworden ist, daß die äu-

ßere Komponente die Membran nicht mehr durchdringen kann. Folge ist auch hier eine asymmetrische Struktur der Membran, die in diesem Fall aufgrund der begrenzten Polyanionenmenge im Innern der Kapsel noch stärker ausgeprägt ist.

Damit die Membran eine ausreichende Stabilität besitzt und die Kapseln nicht sofort wieder zerfallen, sollten für das System CS/PDADMAC folgende Bedingungen erfüllt sein (Dautzenberg *et al.* 1983, 1987, 1996, 1998):

- Einsatz der Polyelektrolyte als Salz
- pH-Wert zwischen 5 und 9
- Eintropfhöhe zwischen 5 bis 20 cm
- Substitutionsgrad des CS zwischen 0,3 und 2,5
- Konzentration des CS zwischen 1 und 10 %
- Viskosität des CS zwischen 100 und 10.000 mPa·s
- Konzentration des PDADMAC zwischen 0,5 und 10 %
- Verhältnis der Viskosität zwischen PDADMAC und CS zwischen 1:10 und 1:100

### 3. 2. 6 Einsatzmöglichkeiten

Polyelektrolyte können aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften in den unterschiedlichsten Bereichen zum Einsatz kommen (Michaels 1965; Dautzenberg *et al.* 1994).

Durch die Existenz oder Einführung ionischer Gruppen in ansonsten unlösliche Polymere können diese wasserlöslich gemacht werden.

Mit **Polyelektrolyten** können z. B. hydrophobe Substanzen in ein stabiles Kolloidsystem überführt werden. Auf diesem Effekt beruhen zahlreiche Anwendungen als Dispersions- und Flockulierungsmittel in der Papier-, Textil-, Wasseraufbereitungs-, Bergbau-, Ölförder-, Bau-, der chemischen Industrie und vielen anderen Bereichen. Aufgrund der Viskosität der Lösungen von Polyelektrolyten werden diese als Verdickungsmittel in der Lebensmittel-, der Kosmetik-, der Pharmaindustrie, aber auch in der Bauindustrie eingesetzt.

Das große Wasserrückhaltevermögen (s. 3. 2. 4) ermöglicht zahlreiche Anwendungen als Absorber.

Weitere Anwendungen haben Polyelektrolyte zur Oberflächenbehandlung und –vorbereitung in der Beschichtungstechnik gefunden.

Aus der Tatsache, daß mit Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen Membranen und Kapseln realisiert werden können, resultieren zahlreiche weitere Anwendungen (Michaels 1965; Dautzenberg *et al.* 1994).

Dadurch daß diese **Membranen** aufgrund ihrer unterschiedlichen Permeabilität für verschiedene Substanzen sehr interessante Transportcharakteristika aufweisen (s. 3. 2. 4), kommen sie zur Trennung und Filtration in vielen Bereichen zum Einsatz,

z. B. bei der Abwasserreinigung, der Reinigung von Flüssigkeiten in der Lebensmittelindustrie (Philip *et al.* 1982), der Meerwasserentsalzung, der Ultrafiltration oder als ionenselektive Membranen. Da viele Polyelektrolyt-Komplexe aus biokompatiblen Materialien bestehen, sind sie auch im biotechnologischen (z. B. zur Trennung von Biopolymeren, Philip *et al.* 1979; Kudela *et al.* 1992) und medizinischen Bereich (z. B. für die Dialyse) geeignet (Chandy und Sharma 1991; Kühtreiber *et al.* 1999). Ferner haben Membranen aus Polyelektrolyt-Komplexen in der Elektrochemie Anwendung z. B. als Trennwand in Batterien oder als fester Elektrolyt in Brennstoffzellen gefunden.

Eine besondere makroskopische Erscheinungsform von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen stellen **Hohlkugeln** dar, die durch ihren flüssigen Kern viele Möglichkeiten und Anwendungen eröffnen (Dautzenberg *et al.* 1983, 1985, 1987; Yao *et al.* 1993; Dautzenberg *et al.* 1994; Yao 1995).

Erste Ansätze zur Herstellung von Hohlkugeln auf Basis von Calciumalginatkugeln (s. 3. 2. 5) finden sich bereits in den 70er und 80er Jahren. Dabei stand anfangs der Einschluß von Biomolekülen und Zellorganellen in eine semipermeable Membran zur Bildung „künstlicher Zellen“ im medizinischen Bereich im Vordergrund (Chang 1972). Ein großer Erfolg war der Einschluß Langerhansscher Inseln zur Diabetesbekämpfung und die Verpflanzung in einen anderen Organismus, ohne daß das Immunsystem diese Zellen sofort ausschaltet (Lim 1979 a, 1979 b; Lim und Sun 1980; Lim und Moss 1981; Lim 1982 a, 1982 b; Lim 1984; Goosen und Sun 1985). Neben dem Schutz vor Immunreaktionen sind die in Hohlkugeln eingeschlossenen Enzyme oder Zellen auch vor einem proteolytischen Abbau geschützt. Ein sehr wichtiger Vorteil ist, daß es durch den flüssigen Kern zu keinem Eingriff in die Struktur der Biomoleküle und den damit verbundenen Änderungen der Aktivität kommt (Pommering *et al.* 1983).

Verkapselt werden neben Enzymen oder Zellen für die heterogene Katalyse in der Biotechnologie (Philipp *et al.* 1979; Daly und Knorr 1988; Knorr und Daly 1988; Pandya und Knorr 1991; Stefuca *et al.* 1991; Förster *et al.* 1994; Kas 1997) auch Nutzmaterien wie z. B. pharmazeutische Wirkstoffe, Pestizide oder Farbstoffe (Dautzenberg *et al.* 1983, 1985, 1987; Yao *et al.* 1993; Dautzenberg *et al.* 1994; Yao 1995). In der Medizin werden verkapselte Zellen z. B. zur Antikörperproduktion eingesetzt (Posillico 1986). Die unterschiedliche Permeabilität der Kapselmembran für verschiedene Substanzen kann dazu eingesetzt werden, diese gezielt über einen bestimmten Zeitraum freizusetzen („controlled release“). Zahlreiche Anwendungen in der Medizin zur kontrollierten Freisetzung von Medikamenten (Polk *et al.* 1984; Daly und Knorr 1988; Knorr und Daly 1988; Takahashi *et al.* 1990; Pandya und Knorr 1991; Lin und Lin 1992; Abletshauser 1993; Hari *et al.* 1996 a; Hari *et al.* 1996 b; Okhamafe *et al.* 1996; Kas 1997) und in der Landwirtschaft zur Freisetzung von Pe-

stiziden, Lockstoffen, Dünger, etc. beruhen auf diesem Effekt (Tsuji 1999; Ohstubo und Tsuji 1999).

Eine Einsatzmöglichkeit in neuerer Zeit ist die Verwendung von Hohlkugeln zur Sicherheitsfermentation gentechnisch veränderter Organismen, deren Anzucht mit hohen Sicherheitsauflagen zum Schutz von Mensch und Umwelt verbunden ist. Durch Einschluß dieser Organismen in Hohlkugeln sollen Fermentationen in üblichen Bioreaktoren in normal ausgestatteten Technika durchgeführt werden können (Eberle 1997).

Eine ganz spezielle Anwendung haben mit Farbstoff gefüllte Kapseln in der Drucktechnik zur Übertragung gefunden, wo sie durch Druck oder Temperatur den Farbstoff an den gewünschten Stellen wieder abgeben (Usami *et al.* 1999).

### **3. 2. 7          Verwendete Polyelektrolyte**

Umfangreiche Darstellungen für die Verkapselung geeigneter Polyelektrolyte finden sich z. B. bei Dautzenberg *et al.* 1994 oder Prokop *et al.* 1998 a, b. Die Verwendung von Alginat ist ebenfalls ausführlich beschrieben (z. B. Lim und Sun 1980; Vorlop und Klein 1983; Vorlop 1984; Hartmeier 1986; Smidsrød und Skjak-Bræk 1990; Thu *et al.* 1996). An dieser Stelle soll nur auf die in der vorliegenden Arbeit überwiegend verwendeten Polyelektrolyte eingegangen werden.

#### **3. 2. 7. 1      Sulfoethylcellulose (SEC)**

Bei dem anionischen Polyelektrolyt Sulfoethylcellulose handelt es sich um einen Celluloseether, der z. B. in einer heterogenen Reaktion des wichtigen nachwachsenden Rohstoffes Cellulose mit Vinylsulfonsäure entsteht (Herzog *et al.* 1989).

Die Auswahl der eingesetzten Cellulose bestimmt bereits die Molmasse des Celluloseethers. Dabei kann das Edukt zwischen einfachen Holzzellstoffprodukten und hochwertigem Linters ausgewählt werden. Durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kann die Kettenlänge und damit auch die Viskosität des späteren Produktes verringert werden.

Im ersten Reaktionsschritt wird die Cellulose bei 20 bis 40 °C mit 1,5 bis 2 M Natronlauge je Mol Cellulose aktiviert (Abb. 3. 5).

Anschließend folgt die Veretherungsreaktion. Als Reagenz wird das Natriumsalz der Ethensulfonsäure ( $\text{CH}_2\text{CHSO}_3\text{Na}$ ) verwendet. Alternativ dazu könnten auch Chloretansulfonat ( $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ , Danilov und Plisko 1964; Gershenovich *et al.* 1969) oder Bromethansulfonat ( $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ , Hoffmann-La Roche 1943) verwendet werden, jedoch ist dies ökologisch bedenklich und bringt keine wirtschaftlichen Vor-

teile. Der Substitutionsgrad (DS) der SEC kann durch die Konzentration und die Reaktionsführung beeinflusst werden.

Nach der Reaktion wird mit Salzsäure neutralisiert und mit Wasser gewaschen.

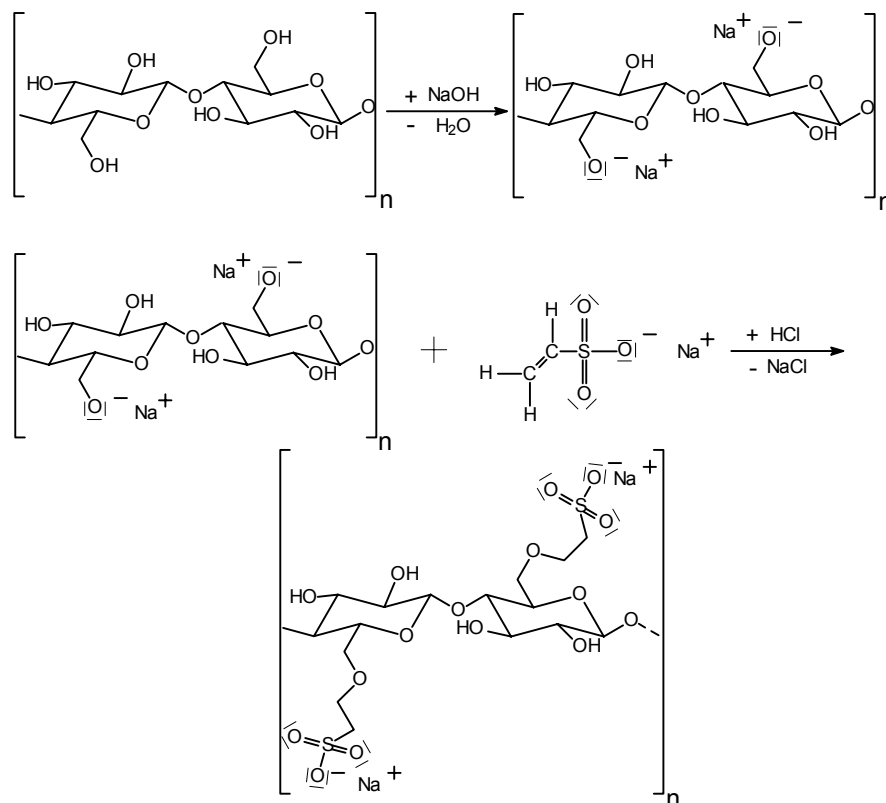


Abb. 3. 5 Sulfoethylcelluloseherstellung aus Cellulose und Vinylsulfonsäure (Herzog *et al.* 1989, Patent Wolff Walsrode AG).

In Lösungen von SEC liegen neben molekulardispers gelösten Anteilen auch Assoziate und Aggregate vor, die in Abhängigkeit von der Konzentration Überstrukturen ausbilden (Thielking 1999).

Anwendung gefunden hat SEC z. B. als Additiv oder Bindemittel in der Keramik- und Glasindustrie (Shin-Etsu Chemical Industry 1981 a, b, c, d, 1982), für Fotobeschichtungen (Himmelman *et al.* 1990), als Verdickungsmittel für Kosmetikprodukte (Shin-Etsu Chemical Industry 1981 b) und Latexfarben (Shin-Etsu Chemical Industry 1981 e), als Additiv in Waschmitteln (Gershenovich *et al.* 1967, 1969), aber auch in Feuerlöschern (Pletnev *et al.* 1980), der Erzwäsche (Plisko *et al.* 1974; Braun *et al.* 1979) oder zur Reduzierung des Wasserverlustes in Bohrschlämmen (Hori *et al.* 1985; Daiichi Kogyo Seiyaku 1984 a, b). Aufgrund ihrer Biokompatibilität wird SEC auch bei der Chromatographie von Peptiden (Jolles 1963) und zur Abtrennung von Leukozyten und Plättchen aus dem Blut verwendet (Kikugawa und Minoshima 1978).

### 3. 2. 7. 2 Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC)

Das Polykation PDADMAC wird technisch in großem Maßstab hergestellt. Es dient als Flockungsmittel zur Wasseraufbereitung und Abwasserbehandlung. Mit PDADMAC können z. B. Kaolin, Mikroalgen, Humussäuren, Öl, Cellulosefasern, Lanthanide, Actinide und unter Zusatz von Aluminiumnitrat ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ) auch Farbstoffe aus Wasser entfernt werden. Darüber hinaus kann PDADMAC auch als Polykation zur Bildung von Polyelektrolyt-Komplexen für Gele, Membranen und Kapseln verwendet werden (s. 3. 2. 5).

Die Herstellung beginnt mit einer zweifachen Alkylierung des preiswerten Dimethylamin mit Allylchlorid in wässriger alkalischer Lösung. Aus dem gebildeten Monomer Diallyldimethylammonium entsteht anschließend durch radikalische Polymerisation das lineare Polymer PDADMAC. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen wird die Synthese in verdünnten Lösungen durchgeführt (Butler 1992; Dautzenberg *et al.* 1994).

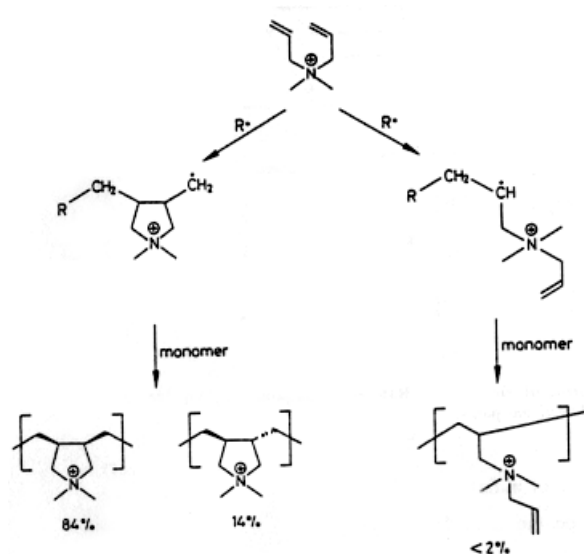


Abb. 3. 6 Cyclopolymerisation von Diallyldimethylammonium zu PDADMAC (Dautzenberg *et al.* 1994).

### 3. 2. 7. 3 Chitosan

Chitosan (Poly[ $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-desoxy-D-glucopyranose]) wird durch N-Deacetylierung aus Chitin hergestellt, dem zweitwichtigsten nachwachsenden Rohstoff nach Cellulose (Abb. 3. 6). Chitin ist z. B. Bestandteil der Schalen von Krustaceen und Insekten, kommt aber auch bei Pilzen und Hefen vor.

Technisch wird Chitosan in großem Maßstab unter Zusatz von starker Natronlauge bei hohen Temperaturen aus Krabbenschalen gewonnen. Der Deacetylierungsgrad kann durch die Wahl der Reaktionsbedingungen beeinflusst werden. Eine fermentative Herstellung mit bestimmten Hefen ist ebenfalls möglich.

Chitosan löst sich gut in sauren wäßrigen Medien (z. B. Essigsäure) unter Bildung hoch viskoser Lösungen, wobei die Löslichkeit stark vom Deacetylierungsgrad abhängt. In Lösung nimmt Chitosan in Abhängigkeit von den Bedingungen Strukturen zwischen der Kugelform und einer zufälligen Helix an (Muzzarelli 1977; Dautzenberg *et al.* 1994; Loth 1997; Kim *et al.* 1999).

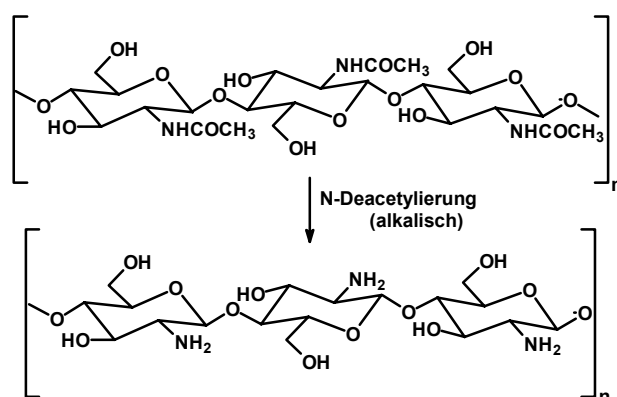


Abb. 3. 7 Herstellung von Chitosan aus Chitin durch N-Deacetylierung.

Chitosan hat Anwendung in den unterschiedlichsten Bereichen gefunden, z. B. in der Medizin zur kontrollierten Freisetzung von Medikamenten aus Gelen und Kapseln, bei medizinischen Fasern und Wundverbänden, zur Beschleunigung der Wundheilung, als antibakterielles Mittel oder Antitumormittel (Polk *et al.* 1984; Muzzarelli 1990; Kas 1997; Arshady 1999; Kim *et al.* 1999; Kühtreiber *et al.* 1999), der Wasseraufbereitung (Muzzarelli 1990; Bader und Birkholz 1996; Kas 1997) oder im Agrarbereich zur kontrollierten Freisetzung von Pestiziden oder zum Saatgut-Coating (Muzzarelli 1990; Bader und Birkholz 1996; Kas 1997).

Chitosan kann durch Re-Acetylierung mit Essigsäure thermoreversible Gele bilden. Durch die regelmäßige Struktur und die hohe Ladungsdichte ist Chitosan wie PDADMAC als Polykation zur Bildung von Polyelektrolyt-Komplexen für Gele, Membranen und Kapseln geeignet (s. 3. 2. 5).

### 3.3 Nematodenprobleme an Kulturpflanzen

Phytopathogene Nematoden sind die am weitesten verbreiteten Schädlinge in der Landwirtschaft, im Gartenbau, der Forstwirtschaft, dem Zierpflanzenbau und dem Weinbau. Immer wieder kommt es zu verheerenden wirtschaftlichen Schäden (Dekker 1969; Nickle 1984; Oerke *et al.* 1994; Webster 1997). Trotz dieser Tatsache gibt es kaum genaue Angaben über die Ertragsverluste (Webster 1997). Jung schätzt die weltweiten Schäden auf 150 Milliarden DM (Anonym 1998 a). Von Sasser und Freckmann (1987) und Burrows *et al.* (1994) wird ein ähnlicher Betrag von mehr als 100 Milliarden US\$ genannt.

Basierend auf einer 1971 durchgeführten Studie der Society of Nematologists liegt der durchschnittliche nematodenbedingte Ernteverlust aller Kulturpflanzen bei 10 %, wobei in Einzelfällen Verluste von 50 % der Ernte auftreten können (Dowler und van Gundy 1984).

Tab. 3. 2 Wichtige von Schadnematoden befallene Kulturpflanzen (Nickle 1984; Krieg und Franz 1989; Luc *et al.* 1990; Riggs und Wrather 1992; Oerke *et al.* 1994).

Kulturpflanze	Schadnematoden
Sojabohne	<i>Heterodera glycines</i> , <i>Trichodorus</i> spp., <i>Belonolaimus</i> spp., <i>Pratylenchus</i> spp., <i>Circonemoides</i> spp., <i>Hoplolaimus</i> spp., <i>Xiphinema</i> spp., <i>Tylenchorhynchus</i> spp., <i>Rotylenchus</i> spp.
Getreide	<i>Heterodera avenae</i> , <i>Heterodera zeae</i>
Gerste	<i>Heterodera avenae</i>
Reis	<i>Hirschmanniella</i> spp., <i>Circonemella</i> spp., <i>Meloidogyne</i> spp.
Hafer	<i>Heterodera avenae</i>
Kartoffel	<i>Globodera rostochiensis</i> , <i>Globodera pallida</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Meloidogyne hapla</i> , <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>Nacobbus aberrans</i> , <i>Pratylenchus penetrans</i>
Raps	<i>Heterodera schachtii</i>
Zuckerrübe	<i>Heterodera schachtii</i> , s. 3. 4
Zuckerrohr	<i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. graminicola</i>
Erdnuß	<i>Meloidogyne arenaria</i> , <i>M. hapla</i> , <i>M. javanica</i>
Gemüse	<i>Meloidogyne</i> spp., <i>Pratylenchus</i> spp., <i>Rotylenchus</i> spp., <i>Heterodera schachtii</i> , <i>Nacobbus aberrans</i> , <i>Paratrichodorus minor</i> , <i>Dolichodorus heterocephalus</i> , <i>Tylenchorhynchus braccicae</i>
Baumwolle	<i>Meloidogyne</i> spp.
Tabak	<i>Meloidogyne</i> spp.



Eine Handvoll Kulturboden enthält meistens mehrere tausend Nematoden, die dort saprophag, räuberisch oder parasitisch an Pflanzenwurzeln, Insekten oder Pilzen leben (Hashem 1988). Von den über 15.000 bekannten Nematodenarten ernähren sich ca. 3.000 von Pflanzen, etwa 100 Arten verursachen teilweise beträchtliche Schäden an Kulturpflanzen (KWS 1999 b; Tab. 3. 2).

### 3. 4 Nematodenprobleme an Zuckerrüben

Zuckerrüben gehören zu den wettbewerbsfähigsten Marktfrüchten (Meinert und Mittenacht 1992). Bei der noch recht jungen Kulturpflanze Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) handelt es sich um eine zuckerreiche Zuchtform der Runkelrübe. Der Samen der Langtagpflanze wächst in etwa 180 Tagen zu einer blütenstengelfreien Pflanze aus. Heute angebaute Sorten enthalten üblicherweise 77,5 % Wasser, 14 % kristallisierbaren Zucker, 2 % nicht kristallisierbaren Zucker, 2 % Nichtzuckerstoffe (z. B. Aminostickstoff, Kalium, Natrium) und 4,5 % Trockensubstanz (KWS 1999 a). Die bei der Zuckerherstellung anfallenden Schnitzel finden feucht oder getrocknet als Viehfutter Verwendung. Ein weiteres Nebenprodukt ist die Melasse.

Bereits im 18. Jahrhundert beschäftigten sich der Berliner Apotheker und Chemiker Andreas Sigismund Marggraf sein Nachfolger Franz Carl Achard mit dem Anbau der Runkelrübe und der technischen Gewinnung von Zucker. Mit der Errichtung der ersten Rübenzuckerfabrik der Welt in Cunern/Schlesien begann die Ausbreitung der Rübenzuckerindustrie in ganz Europa. Mit der Intensivierung des Zuckerrübenanbaus verbreitete sich auch der Zuckerrübenematode. Die sogenannte „Rübenmüdigkeit“ von Feldern, auf denen in kurzen Abständen Zuckerrüben angebaut wurden, konnte sehr bald auf einen Befall mit *Heterodera schachtii* zurückgeführt werden. Die Ernteverluste waren so groß, daß 1876 in Deutschland 24 Zuckerfabriken schließen mußten (Liebscher 1878; Kühn 1881, 1882).

Zu ersten großen Problemen mit dem Zuckerrübenematoden *H. schachtii* in jüngerer Zeit kam es aufgrund immer größerer Erträge und immer kürzerer Fruchtfolgen bereits in den 70er Jahren. Zunächst wurden die Nematoden mit chemischen Mitteln wie den Granulaten Temik 10G® und Dacamox® und dem Spritzmittel Vydate® bekämpft. Die hohen Kosten der chemischen Nematodenbekämpfung und die im Vergleich dazu zu geringe Befallsverminderung und schließlich die Einschränkung und das Verbot umweltfeindlicher Wirkstoffe wie z. B. Methylbromid oder Aldicarb machen andere Methoden zur Eindämmung des Nematodenbefalls erforderlich (Kessel 1977; Stirling 1988 a, 1991, 1992; Kerry 1993, 1995; Bridge 1996; Kerry und Evans 1996; Kerry und Jaffee 1997; Kerry 1998; s. 3. 5).

Besonders in den traditionellen Zuckerrübenanbaugebieten in Mitteleuropa gibt es große Probleme mit dem Nematoden *H. schachtii*. Er stellt dort neben der virösen Wurzelbärtigkeit Rizomania häufig den ertragsbegrenzenden Faktor dar.

Der jährliche Schaden liegt allein in der Bundesrepublik Deutschland bei über 200 Millionen DM (Schlang 1991). Nach Schätzungen sind ein Drittel aller Zuckerrübenanbauflächen in Deutschland von *H. schachtii* befallen. Bei zu häufigem Anbau von Zuckerrüben erreicht der Ertragsverlust 25 % (Weischer und Steudel 1972), in Einzelfällen treten Ertragseinbußen von bis zu 45 % auf (Rieckmann und Sieck 1995). Die wirtschaftliche Schadensschwelle liegt bei nur 500 Eiern und Larven des

Nematoden je 100 ml Boden (Schlang 1998, Tab. 3. 3). Bei dieser Verseuchungsdichte des Bodens ist mit Ertragseinbußen von ca. 5 % zu rechnen (KWS 1999 b). Geht man von einer Ertragserwartung von 55 Tonnen Zuckerrüben je Hektar aus, macht ein Minderertrag von 30 % einen finanziellen Verlust von 1.700 DM je Hektar aus (Heinrichs 1998).

Tab. 3. 3 Bewertung der Nematodenverseuchung im Zuckerrübenanbau (Kessel, 1977; KWS 1999 b)

Befalls- klasse	Zysten/ 100 ml Erde	Eier+Larven/ 100 ml Erde	Befall	Verlust in %	Bewertung
0	0	0	-	-	-
I	1 - 5	ca. 150	leicht	-	keine Bedenken
II	6 - 10	150-800	leicht, keine Nesterbildung	3-5	keine Bedenken bei 3jähriger Fruchtfolge
III	11 - 20	800-1500	mäßig, Nesterbildung	6-12	Rüben nicht häufiger als jedes 4. Jahr
IV	21 - 40	1500-2500	schwer, teilw. große Nester u. Kahlstellen	12-20	Rübenanbau 5-6 Jahre aussetzen
V	> 41	> 2500	sehr schwer, ausge- dehnte Kahlstellen	> 25	Rübenanbau 6-8 Jahre aussetzen

Im Jahr 1999/2000 haben allein in der Bundesrepublik Deutschland 55.869 Rübenanbauer auf einer Fläche von 488.391 Hektar (Abb. 3. 8) 26,4 Millionen Tonnen Zuckerrüben geerntet. Daraus wurden über 4 Millionen Tonnen Zucker hergestellt. In der Europäischen Union wurden 1999/2000 auf einer Fläche von fast 2 Millionen Hektar mit 16 Millionen Tonnen rund 14 % des weltweit erzeugten Zuckers hergestellt (Wirtschaftliche Vereinigung Zucker 1999).

Weltweit kommt der Zuckerrüben nematode zusätzlich in Asien, Nordamerika und Australien vor (Jung 1998; KWS 1999 b). Mehr als 90 % der von Nematoden verursachten Schäden an Zuckerrüben werden auf *H. schachtii* zurückgeführt (Good 1968; Anonym 1970). In den USA sind in starken Befallsgebieten totale Ernteaussfälle keine Seltenheit (Weischer und Steudel 1972).

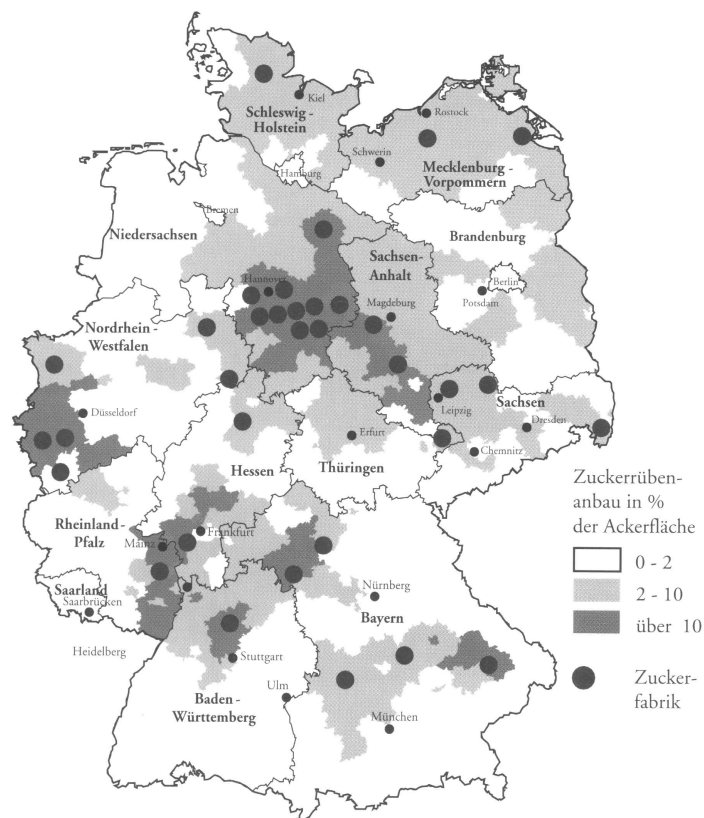


Abb. 3. 8 Standorte des Zuckerrübenanbaus in Deutschland (Wirtschaftliche Vereinigung Zucker 1999).

### 3. 5 Der Zystennematode *Heterodera schachtii*

Der Zuckerrübenneematode *Heterodera schachtii* A. Schmidt 1871 wurde 1859 von dem Bonner Botaniker H. Schacht in Deutschland in der Nähe von Halle an der Saale entdeckt (Schacht 1859 a, 1859 b). Eine umfangreiche Beschreibung erfolgte 1871 von A. Schmidt (1871, 1872), die von Strubell (1888), Chatin (1888, 1891) und später von Raski (1949) vervollständigt wurde. Der Befall der Zuckerrüben und der Krankheitsverlauf wurden zuerst von Nemec (1910, 1911, 1933) beschrieben. Es folgten erste Arbeiten von Hijner (1952) und Bergmann (1958) über die Wirt-Parasit-Beziehung.

Der phytoparasitäre Nematode *Heterodera schachtii* Schmidt wird innerhalb des Stammes der Nematelminthes/Rundwürmer in die Klasse der Nematoda/Fadenwürmer eingeordnet. In dieser Klasse findet er sich in der Ordnung *Tylenchida* (Decker 1969; Freye 1984).

Der Lebenszyklus von *Heterodera schachtii* (Abb. 3. 9) ist typisch für alle bekannten Spezies dieser Art (Decker 1969; Steele 1984; Schäufele 1982; Börner 1983; Atlas der Krankheiten und Schädlinge der Rübe 1985; Rieckmann und Steck 1995; Jung und Wyss 1999; KWS 1999 b). Der Nematode überdauert im Boden als Ei innerhalb einer braunen, stecknadelkopfgroßen Zyste. Eine Zyste enthält 200-500 Eier (Jaffee 1992). Auch ohne einen von den Wirtspflanzen ausgehenden Schlupfreiz entwickeln sich im Frühjahr aus einem Teil der Eier Larven (J1), die sich noch in der Zyste ein erstes Mal häuten (J2). Die übrigen Eier verbleiben in der Zyste. Sie sind bis zu zehn Jahre lebensfähig. Die hellen Larven des 2. Entwicklungsstadiums (J2), bei denen keine Geschlechtsdifferenzierung vorliegt, sind etwa 450 µm lang und 20 µm breit. Sie verlassen die schützende Zyste, durchwandern schlängelnd den Boden und suchen, angelockt durch die Wurzeln der jungen Pflanzen, ihren Wirt auf. Die Wandergeschwindigkeit und die zurückgelegten Strecken sind dabei gering. Als Folge dieser Tatsache ist ihre massenweise Vermehrung oft auf Befallsnester innerhalb des Pflanzenbestandes beschränkt. Mit Hilfe ihres Mundstachels dringen die Larven kurz hinter der Wurzelspitze in die Faserwurzeln der Zuckerrübe ein. Dort induzieren sie sofort die Ausbildung eines Nährzellensystems (Syncytium), das die Grundlage für die weitere Nematodenentwicklung bildet. Sie geben Enzyme ab, um Zell- und Pflanzeninhaltsstoffe in eine verwertbare Form zu überführen. Bei den Larven des 3. und 4. Entwicklungsstadiums, die bereits 1 - 2 Wochen nach dem Eindringen in die Wurzel erreicht werden, kommt es zur Geschlechtsdifferenzierung. Die Männchen behalten ihre Wurmform bei, während sich der Umfang der Weibchen auf 0,2 bis 0,8 mm erweitert. Die weißen Weibchen, die in diesem Stadium gut mit bloßem Auge sichtbar sind, brechen mit ihrem Hinterende aus der Wurzel heraus, bleiben aber mit dem Kopf im Syncytium verankert. Die Männchen verlassen die Wurzeln und suchen aktiv die Weibchen auf, um sie zu begatten. Im Körper des Weibchens reifen

anschließend die Eier heran, wobei das weiße Weibchen abstirbt und sich zur braunen, zitronenförmigen Zyste wandelt. Die Zysten bleiben auch nach Absterben bzw. Entfernen der Wirtswurzeln im Boden zurück. Durch Verschleppen von Boden über Schlepperreifen, Bodenbearbeitungsmaschinen und Erntemaschinen können die Zysten verbreitet werden.

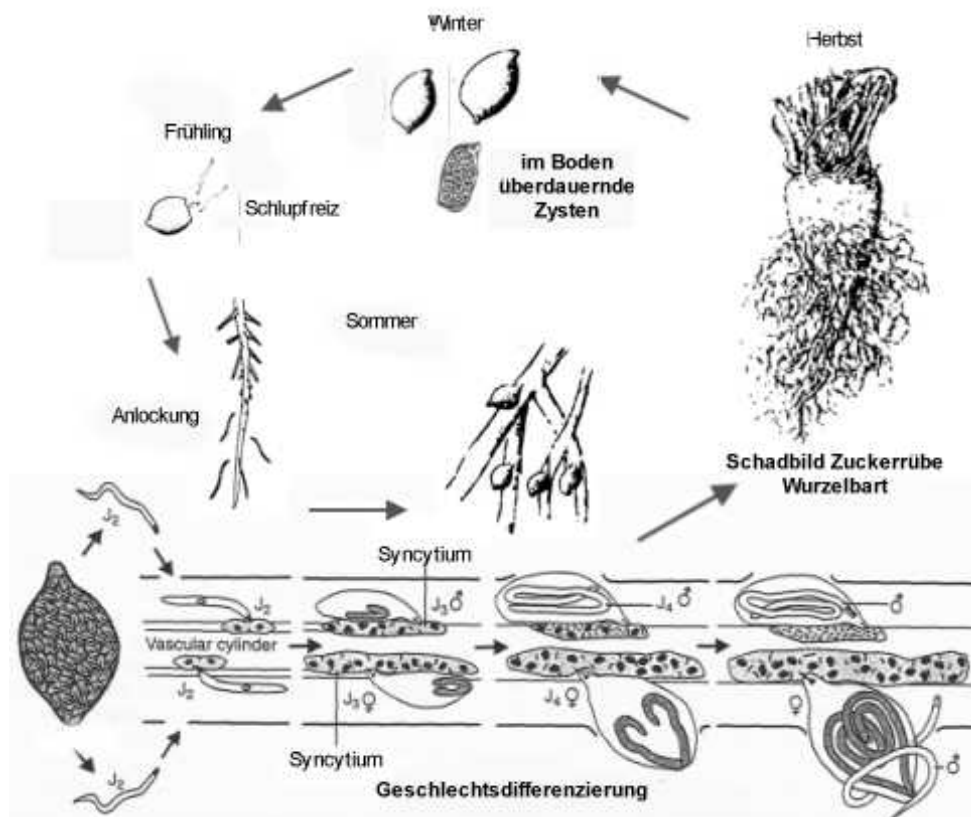


Abb. 3. 9 Lebenszyklus des Zuckerrüben nematoden *Heterodera schachtii* (nach Börner 1983; Jung und Wyss 1999, verändert)

Unter mitteleuropäischen Klimaverhältnissen können sich 2-3 Generationen pro Jahr entwickeln, wobei die Temperatur (speziell die Temperatursumme) und die Feuchtigkeit entscheidenden Einfluß auf die Generationszahl haben. Ideal für die Vermehrung sind hohe Bodentemperaturen, mittlere Korngrößen (150 – 250 µm) und mittlere Bodenfeuchten (Fichtner 1985, 1986; KWS 1999 b).

Die junge Zuckerrübenpflanze reagiert auf den Nematodenbefall mit der vermehrten Bildung von Seitenwurzeln. Da auch diese befallen werden können, entsteht ein Geflecht aus kleinen Wurzeln, der sog. „Wurzelbart“ (Abb. 3.10). Die Pflanze zeigt aufgrund der Wachstumshemmung ein kümmerliches Wachstum mit entsprechend vermindertem Ertrag.

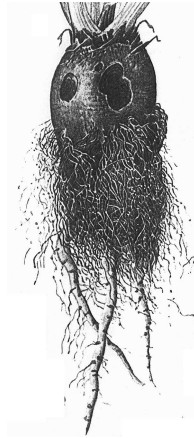


Abb. 3. 10 Schadbild (Atlas der Krankheiten und Schädlinge der Rübe 1985).

Eine weitere Folge eines Nematodenbefalls können Sekundärinfektionen der Wirtspflanze sein. Durch das Anstechen der Wurzelzellen mit dem Mundstachel der Nematoden können mit Viren, Bakterien oder Pilzen weitere Krankheitserreger in die Pflanze eindringen.

### 3. 6 Möglichkeiten zur Nematodenbekämpfung

Die Notwendigkeit einer Bekämpfung phytopathogener Nematoden ergibt sich zwangsläufig durch die immer enger gestellten Fruchtfolgen ganz bestimmter Kulturpflanzen und die damit verbundenen, zum Teil erheblichen Schäden (s. 3. 3).

Insgesamt gehen bis zur Ernte etwa ein Drittel der weltweit erzeugten Nahrungsmittel durch Schädlinge, Pflanzenkrankheiten und Unkräuter verloren, weitere 15 % werden bei der Lagerung vernichtet. Zur Sicherung der Ernte und damit auch der Lebensmittelversorgung der noch immer ansteigenden Weltbevölkerung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, deren Kombination als Integrierter Pflanzenschutz bezeichnet wird (Fugmann *et al.* 1991; Oerke *et al.* 1994; Alexandratos 1995). Der Integrierte Pflanzenschutz ist definiert als Verfahren, bei dem alle wirtschaftlich, ökologisch und toxikologisch vertretbaren Methoden gemeinsam verwendet werden, um Schadorganismen unter die wirtschaftliche Schadensschwelle zu bringen, wobei die bewußte Ausnutzung aller natürlichen Begrenzungsfaktoren im Vordergrund steht (Ertragssicherung durch ein Minimum an Pflanzenbehandlungsmitteln). Unter der wirtschaftlichen Schadensschwelle versteht man diejenige Befallsdichte von Schadorganismen, bei der die Kosten für eine Bekämpfung ebenso groß sind wie der zu erwartende Schaden. Dabei stellt sie keinen konstanten Wert dar, sondern ist abhängig u. a. von Standort, Sorte, Kulturmaßnahmen, Witterungsbedingungen, Selbstregulationspotential, Ertragserwartung, Behandlungskosten, Nebenwirkungen, etc. Die Definition der integrierten Schädlingsbekämpfung schließt alle brauchbaren physikalischen, chemischen, biotechnischen, biologischen und gentechnischen Methoden ein (Krieg und Franz 1989; König 1990 a; Fugmann *et al.* 1991; Meinert und Mitnacht 1992; Pflanzenschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland vom 14. Mai 1998 § 2, 2).

#### 3. 6. 1 Chemische Bekämpfung

Die ersten chemischen Nematizide („MB“ = Methylbromid, „DD“ = 1,3-Dichlorpropen + 1,2-Dichlorpropan und weitere halogenierte C<sub>3</sub>-Verbindungen, „EDB“ = Ethylendibromid und „DBCP“ = 1,2-Dibrom-3-chlorpropan) kamen in den 40er und 50er Jahren auf den Markt. Zu diesen Bodenbegasungsmitteln kamen nach 1960 weitere Mittel auf Basis von Organophosphaten und Carbamaten, die nematizide und insektizide Wirkungen haben. In der zweiten Hälfte der 70er Jahre wurde festgestellt, daß DBCP krebserregend ist und die Zahl der Spermien bei Männern reduziert, was 1977 zu einem ersten Verbot in den USA führte (Hague und Gowen 1987; Raski *et al.* 1981; Johnson und Feldmesser 1987; Stirling 1991). Zahlreiche weitere Verbote folgten, als man auch die Grundwassergefährdung der genannten Verbindungen er-



kannte (Peoples *et al.* 1980; Zaki *et al.* 1982; Jones und Black 1983; Cohen *et al.* 1984; Wixted *et al.* 1987). Auch das gegen Nematoden besonders wirksame Methylbromid ist schon lange wegen seiner hohen Toxizität und Umweltgefährdung in vielen Bereichen verboten. Es wurde als Bodenbegasungsmittel mit 50-100 g/m<sup>2</sup> eingesetzt und war bei einer Einwirkzeit von 24-48 Stunden bis zu einer Bodentiefe von 30 cm wirksam (Bell *et al.* 1996).

Im Zuckerrübenanbau in Deutschland wurden lange Zeit gegen Nematoden die Granulate Temik 10G<sup>®</sup> und Dacamox<sup>®</sup> und das Spritzmittel Vydate<sup>®</sup> eingesetzt. Besonders häufig wurde das Insektizid, Akarizid und schlupfhemmende Nematizid Temik 10G<sup>®</sup> verwendet. Der enthaltene Wirkstoff Aldicarb [(2-Methyl-2-(methylthio)-propionaldehyd-O-methyl-carbamoyloxim)] ist jedoch heute nicht mehr zugelassen, da er sich als gefährlich für Bienen, Vögel, Fische, Fischnährtiere und Algen erwiesen hat, ins Grundwasser gelangt und in Wasser nur schwer abbaubar ist (Baron 1994). Als Vergiftungserscheinung von Aldicarb tritt eine spontan reversible, dosisabhängige Cholinesteraseaktivitätshemmung auf, die zur Erregung des parasynaptischen Nervensystems führt, aber auch Atemlähmung zur Folge haben kann. Ferner wirkt Aldicarb nur auf den Frühbefall der Nematoden (Thiede 1988).

In Deutschland sind zur Zeit nur noch die Nematizide Basamid<sup>®</sup> und Hostathion<sup>®</sup> zugelassen (BBA 2000). Das Granulat Basamid<sup>®</sup>, das den Wirkstoff Dazomet enthält, darf mit diversen Einschränkungen in Gemüsekulturen, im Zierpflanzenbau und in Baumschulen gegen wandernde Wurzelnematoden und Wurzelgallennematoden eingesetzt werden. Hostathion<sup>®</sup> mit dem Wirkstoff Triazophos ist für den Einsatz gegen Blattnematoden im Zierpflanzenbau zugelassen. Die Zulassung von Basamid<sup>®</sup> endet am 31.12.2003, die Zulassung von Hostathion<sup>®</sup> am 31.12.2004 (BBA 2000).

Eine chemische Nematodenbekämpfung ist mit hohen Kosten und teilweise hohem Aufwand z. B. für Wiederholungsanwendungen verbunden (Kessel 1977, 1979; Rasiki *et al.* 1981; Hague und Gowen 1987; Stirling 1991; Oerke *et al.* 1994). Sind die Nematoden erst einmal in die Pflanze eingewandert, können sie noch schwieriger bekämpft werden (Bunt 1975; McLoed und Khair 1975). Dabei ist der Erfolg der teuren Nematizide keineswegs garantiert. Die Kosten sollten im Zuckerrübenanbau 400 DM pro Hektar nicht überschreiten (Fugmann *et al.* 1992). Ihr Einsatz führt, wie in vielen anderen Bereichen auch, zu einem starken Selektionsdruck auf die Population und zur Resistenzbildung. Der Einsatz von unspezifischen Bodenbegasungsmitteln kann das empfindliche Ökosystem Boden nachhaltig stören. Ferner können mit chemischen Pflanzenschutzmitteln Nematoden nur bis zu einer maximalen Bodentiefe von 30 cm bekämpft werden. Nematoden in größeren Tiefen entziehen sich generell einer chemischen Bekämpfung (Bell *et al.* 1996).

Die Entwicklung und Zulassung neuer Nematizide ist aufgrund zahlreicher Anforderungen an chemische Pflanzenschutzmittel (z. B. niedrige Aufwandmengen pro

Hektar, artspezifische biologische Wirkung, Verhinderung von Resistenzen, gute Abbaubarkeit sowie geringe Auswaschbarkeit in verschiedenen Böden, geringe Human- und Ökotoxizität, gute Formulierbarkeit mit Kombinationspartnern, gutes Preis-Leistungsverhältnis) sehr zeit- und kostenintensiv. So wird im Durchschnitt von 15.000 untersuchten Substanzen nach 11 Jahren und Kosten von 290 Millionen DM ohne die Kosten für die Produktionsanlage eine Substanz von der BBA als Pflanzenschutzmittel zugelassen (König 1990 b; Meinert und Mittnacht 1992; Anonym 1998 b, 1998 c; Fiedl 1998; Pflüger 1998; Industrieverband Agrar 1999 a, 1999 b; Abb. 3. 11). Verzögert sich die Zulassung um nur eine Wachstumsperiode, entgeht dem betroffenen Unternehmen ein Gewinn von 10 Millionen DM (Anonym 1998 c). Bei einem Produkt, das weltweit verkauft werden soll, ist allein mit Zulassungskosten von 80 Millionen DM zu rechnen (Pflüger 1998). Die Zulassung eines Pflanzenschutzmittels gilt höchstens 10 Jahre und kann jederzeit widerrufen werden. Nach Ablauf der Zulassungszeit ist eine erneute Prüfung und Zulassung erforderlich (Pflanzenschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland vom 14. Mai 1998 § 16 und § 16 a).

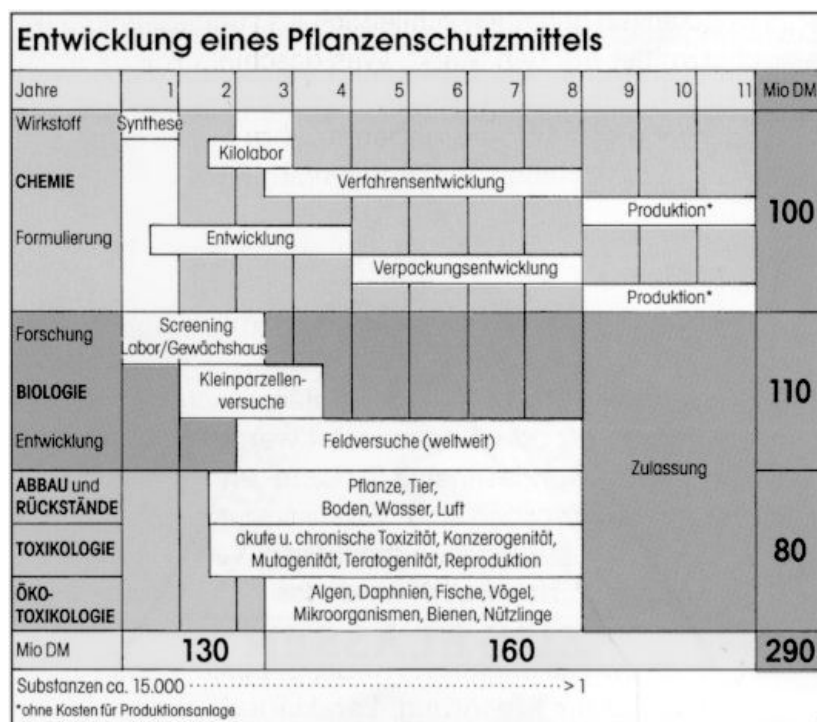


Abb. 3. 11 Zeit- und Entwicklungskosten für ein Pflanzenschutzmittel  
(Industrieverband Agrar 1999 a, 1999 b)

Für Abnehmer geringer Mengen Pflanzenschutzmittel (z. B. die Gartenbauwirtschaft) lohnt die Entwicklung und Zulassung in der Regel nicht (Rothenburger und Quarrell-Reichle 1998).

Durch gezielten Einsatz, gute Diagnoseverfahren, moderne Ausbringungstechniken und effektive Wirkstoffe sind die eingesetzten Wirkstoffmengen in den EU-Ländern rückläufig (Anonym 1998 d).

Immer häufiger auftretende Resistenzen gegen die eingesetzten Mittel stellen ein großes Problem dar (Fugmann *et al.* 1991).

Natürliche Pflanzenschutzwirkstoffe, die zwar zum Teil eine sehr hohe Spezifität haben, sind meistens nicht in ausreichenden Mengen verfügbar oder sie sind unbeständig gegen Licht und Luft. Häufig ist ihre Struktur zu komplex und zu teuer für eine synthetische Herstellung. Daher verwundert es nicht, daß diese Substanzen bisher nur in kleinen Nischenmärkten z. B. bei Pheromonen zu finden sind (Fugmann *et al.* 1991, 1992).

Ein immer größer werdendes Problem stellt die gesellschaftliche Akzeptanz des chemischen Pflanzenschutzes dar, der nach Einschätzung durch die öffentliche Meinung in Bezug auf die ökologischen Nachteile und Risiken ein kritisches Maß erreicht hat (Fugmann *et al.* 1991).

In jüngster Zeit wird in einigen Ländern der EU eine Abgabe auf Pflanzenschutzmittel erhoben. In Dänemark (seit 1996), Schweden (seit 1995), Finnland, den Niederlanden, Belgien und Frankreich (seit 2000) ist die differenzierte Besteuerung der Pflanzenschutzmittel je nach Toxizität der enthaltenen Mittel bereits eingeführt, in Großbritannien ist sie in Planung (Anonym 1999 a, 1999 b; Preusse 2000). Der Wirkstoff Aldicarb<sup>®</sup> (s. o.) wird dabei besonders hoch besteuert (Preusse 2000).

Bei all den Problemen mit Nematiziden verwundert es nicht, daß eine Neuentwicklung dieser Art von Pflanzenschutzmittel eher fraglich erscheint (Brown und Kerry 1987). Zur Eindämmung des Nematodenbefalls von Kulturpflanzen werden daher andere Methoden diskutiert und gefordert (Wyss und Voß 1986; Stirling 1988 a; de Haan 1998; Stirling 1991, 1992; Kerry 1993, 1995; Bridge 1996; Kerry und Evans 1996; Kerry und Jaffee 1997; Kerry 1998).

### **3. 6. 2 Kulturtechnische Maßnahmen**

Die einfachste Maßnahme, die Vermehrung des Zuckerrüben nematoden zu unterbinden, ist der Anbau der Rüben in einer weiten Fruchtfolge. Optimale Fruchtfolgen lassen sich in der Praxis aufgrund technischer, arbeitswirtschaftlicher, markt- und betriebswirtschaftlicher Gegebenheiten jedoch selten einhalten (Heinicke 1990; Meiner und Mitnacht 1992).

Wie häufig die Zuckerrübe angebaut werden kann, richtet sich nach dem Nematodenbefall des Bodens (s. Tab. 3. 4). Auch wenn keine Wirtspflanze angebaut wird, kommt es zu einem spontanen Schlupf eines Teils der Larven, die dann aber ihren

Entwicklungszyklus nicht fortsetzen können (s. 3. 4). Auf diese Weise reduziert sich der Befall im Boden. Der Bekämpfungserfolg hängt jedoch stark von der Bodentemperatur ab, da der Schlupfreiz der Nematoden erst bei Temperaturen oberhalb von 8 °C ausgelöst wird (Windt und Koch 1998).

Die Bekämpfung durch den Anbau resistenter Ölrettich- oder Senfsorten (Heinicke 1990; Thomas und Meyer 1995) oder den Anbau von Feindpflanzen (z. B. *Tagetes*-Arten) im Rahmen der Flächenstillegung oder als Zwischenfrucht gestaltet sich zunehmend schwieriger. Die Wintergerste wird vielerorts immer mehr aus der Fruchtfolge verdrängt. Stattdessen werden Stoppelweizen oder Hybridroggen angebaut. Dadurch verspätet sich die Aussaat der Zwischenfrucht um zwei bis drei Wochen. Die verbleibende Vegetationszeit bzw. die für ein Schlüpfen der Nematodenlarven benötigte Bodentemperatur reicht dann oft nicht mehr für eine befriedigende Bekämpfung aus. Die Nutzung der Flächenstillegung spielt ferner beim derzeitigen Stillegungssatz eher eine untergeordnete Rolle (Tralle und Blumenberg 1998).

Beim Anbau resistenter Ölrettich- oder Senfsorten ist zu beachten, daß ein Bekämpfungserfolg stark von abiotischen Faktoren wie z. B. der Temperatur abhängt. Die große genetische Variabilität des Saatgutes resultiert in einzelnen anfälligen Pflanzen, die eine wirkungsvolle Entseuchung verhindern (Steudel und Müller 1981; Müller und Steudel 1982; Steudel *et al.* 1985). Ein vorbeugender Anbau ist daher nicht zu empfehlen, da geringe Populationen sogar vermehrt werden können (Heinicke 1990).

Physikalische Bekämpfungsmaßnahmen wie z. B. Überflutung, Bodensolarisation oder das Dämpfen seien hier nur erwähnt, da ein Bekämpfungserfolg häufig gering ist oder nur mit sehr hohem Aufwand zu erreichen ist (Decker 1969; Hege und Roß 1972; Bridge 1987; Brown 1987; Meinert und Mittnacht 1992; Hoffmann *et al.* 1994; Bridge 1996; Whitehead 1998).

### **3. 6. 3        Nematodenresistente Kulturpflanzen**

Resistente Kulturpflanzen unterdrücken die Vermehrung des Nematoden, während tolerante Pflanzen weniger geschädigt werden und daher auch unter Befall stabile Erträge bringen. Resistenz und Toleranz sind unterschiedliche Eigenschaften der Pflanze, die in der Regel unabhängig voneinander durch spezifische Gene vererbt werden. Im Gegensatz zum praktischen Landwirt, der von einer resistenten Kulturpflanze erwartet, daß diese trotz Anwesenheit des Schädling keinen Schaden erleidet, bezeichnen Nematologen mit Resistenz eine Eigenschaft, die die Fortpflanzung einer bestimmten Nematodenart begrenzt (Müller 1998).

Bei der sehr bedeutenden Kulturpflanze Sojabohne, deren Anbau von großen Nematodenproblemen begleitet ist (s. 3. 3), hat man schon früh nematodenresistente

Sorten gezüchtet (z. B. Ross und Brim 1957). Zahlreiche weitere Sorten unterstreichen die intensiven Bemühungen um die Lösung des Problems (Ross und Brim 1966; Hartwig und Epps 1978; Anand *et al.* 1985). Die Züchtung und der Anbau der resistenten Sorten führten jedoch nur zu einem kurzfristigen Erfolg, da es durch einen starken Selektionsdruck auf die Nematodenpopulation schnell zur Überwindung der Resistenz kam (Young und Hartwig 1988). Im folgenden wurde daher der parallele Anbau resistenter und nicht resistenter Sorten intensiv untersucht (z. B. Anand *et al.* 1995). Als Kompromiß soll dabei durch die nicht resistenten Sojapflanzen der Selektionsdruck verringert werden, während die resistenten Pflanzen den Ertrag sichern.

Während in Frankreich erste Zuckerrübensorten mit Resistenz gegen *Heterodera schachtii* bereits 1996 auf dem Markt eingeführt wurden, hat in Deutschland das Bundessortenamt erst 1998 mit „Nematop“ des Züchters Hilleshög die erste Sorte zugelassen. Bei dieser Sorte wurde durch klassische Züchtungsarbeit die in der Wildrübe *Beta procumbens* gefundene Resistenz in vorhandene Sorten eingekreuzt. Durch intensive Züchtungsarbeit konnten die naturgemäß mit übertragenen, unerwünschten Eigenschaften weitgehend eliminiert werden. Bedauerlicherweise ist gerade bei der Zuckerrübe die Resistenz nicht mit einer Toleranz gegenüber einem Nematodenbefall verbunden, so daß zwar die Vermehrung des Nematoden unterdrückt wird, eine Schädigung der Pflanzen aber dennoch auftritt. Die eingekreuzte Resistenz führt dazu, daß die Nährzellen (Syncytien, s. 3. 4) nicht die für die Entwicklung der Weibchen erforderliche Größe erreichen, so daß fast ausschließlich Männchen entstehen. Der hohe Preis des resistenten Saatguts macht einen Anbau nur bei sehr extremem Befall sinnvoll. Ein Problem besteht zusätzlich im häufig vergesellschafteten Auftreten von Nematoden und der virösen Wurzelbärtigkeit (Rizomania), da die nematodenresistenten Sorten nicht gegen Rizomania tolerant sind und umgekehrt (Jung 1998; Tralle und Blumenberg 1998; Müller 1998).

Auch die Gentechnik eröffnet für die Züchter neue Möglichkeiten, nachdem nach Identifikation des Resistenzgens *Hs1<sup>pro-1</sup>* gegen *Heterodera schachtii* zukünftig das gezielte Einkreuzen der Resistenz in vorhandene leistungsfähige Zuckerrübensorten möglich ist (Jung 1997; Kleine *et al.* 1997; Jung und Wyss 1999). Problematisch ist allerdings die geringe gesellschaftliche Akzeptanz gentechnischer Arbeitsmethoden (Anonym 1997; Tappeser 1997).

Die aus Wildrüben eingekreuzten Resistenzgene wirken zwar sehr spezifisch, können aber durch entsprechende Virulenzgene der Nematoden überwunden werden. Es ist daher schon bevor nematodenresistente Zuckerrübensorten überhaupt richtig zur Verfügung stehen abzusehen, daß die Resistenz gegen *Heterodera schachtii* nur begrenzte Zeit genutzt werden kann. Es wird daher der Aufbau einer Resistenz auf breiterer Basis gefordert, die auch Toleranz kodierende Gene mit einschließt, obwohl hier die methodischen Möglichkeiten noch völlig fehlen (Müller 1992, 1998).

### **3. 6. 4            Biologische Nematodenbekämpfung**

#### **3. 6. 4. 1        Biologische Schädlingsbekämpfung**

Die biologische Schädlingsbekämpfung ist definiert als die „gesteuerte Nutzung von Organismen (und Viren) und deren Leistung zum Schutz von Pflanze und Tier (einschließlich des Menschen) gegenüber biotischen und abiotischen Schadfaktoren“ (Krieg und Franz 1989).

Durch ein gestiegenes Umweltbewußtsein gewinnt die biologische Schädlingsbekämpfung als Teil des integrierten Pflanzenschutzes (s. 3. 5) immer stärker an Bedeutung. Wurden z. B. 1980 nur wenige Nützlinge kommerziell produziert, so wird bei einem jährlichen Wachstum von 30 % um 2000 bereits ein Markt von 1 Milliarde US Dollar vorausgesagt (Lloyd-Evans und Barfoot 1996; Engelberth 1997). Das US Landwirtschaftsministerium geht davon aus, daß biologische Produkte eines Tages bis zu 10 % des gesamten Pflanzenschutzmittelmarktes ausmachen (Gorman 1992). Das Biocontrol of Plant Diseases Laboratory (BPD, Beltsville, USA) des US Landwirtschaftsministeriums führt eine ständig aktualisierte Liste aller derzeit erhältlichen kommerziellen biologischen Schädlingsbekämpfungsmittel mit Angabe des verwendeten Antagonisten, des Schädlings, der betroffenen Kulturpflanze, der Art der Formulierung, der Anwendung und des Herstellers. Die Liste kann z. B. im Internet eingesehen werden (<http://www.barc.usda.gov/psi/bpd/bpdprod/bioproduct.html>).

In Deutschland müssen alle Pflanzenschutzmittel vor ihrer Zulassung geprüft werden. Auf internationaler Ebene führt auch die Arbeitsgruppe „Pflanzenschutzmittel und Nutzorganismen“ der International Organisation for Biological Control (IOBC) Untersuchungen durch.

Tab. 3. 4 zeigt Vor- und Nachteile der Anwendung von Nützlingen zur biologischen Schädlingsbekämpfung (Engelberth 1997).

Die größte Bedeutung unter den mikrobiologischen Pflanzenschutzmitteln hat der *Bacillus thuringiensis*. Seine weltweite Jahresproduktion wird auf 3.000 bis 4.000 t geschätzt, was einer behandelten Fläche von über 4 Millionen Hektar entspricht (Engelberth 1997). *B. t.*-Präparate wirken gegen viele Insekten. Die relativ unempfindlichen Sporen von *B. t.* enthalten einen Proteinkristall, der sich nach oraler Aufnahme der Spore durch das Insekt auflöst und die Insektendarmwand paralyisiert. Anschließend keimen die Sporen in der Körperhöhle (Krieg und Franz 1989). Es sind jedoch schon erste Resistenzen gegen *B. t.* aufgetreten, die auch dadurch gefördert werden, daß Kulturpflanzen mit Hilfe gentechnischer Methoden mit dem *B. t.*-Gen zur Produktion des Proteinkristalls ausgestattet und damit gegen Insektenbefall geschützt werden (Weiden 1997; Anonym 1998 e; Anonym 1999 c).

Tab. 3. 4 Vor- und Nachteile der Anwendung von Nutzorganismen zur biologischen Schädlingsbekämpfung (Engelberth/Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (aid) e.V. 1997)

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Wirksamkeit bei sachgemäßer Anwendung</li> <li>• Keine Rückstände an Pflanzen und Erntegut</li> <li>• Schonung vorhandener Nutzorganismen, biologische Verfahren sind selektiv</li> <li>• Keine Gefahr von Resistenzbildung</li> <li>• Die Ausbringung ist leicht durchführbar und benötigt keine komplizierten Geräte</li> <li>• Die Ernte ist jederzeit möglich und erfordert keine Wartezeiten wie bei chemischen Pflanzenschutzmitteln</li> <li>• Keine einschränkenden Auflagen, wie z. B. Randzonen, Gewässerschutz, Wasserschutzgebiete usw.</li> <li>• Eine Kombination mit weiteren biologischen ertragsfördernden Maßnahmen ist möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mangelnde Kenntnisse über die Biologie von Schadorganismen und Nutzorganismen können die Ursache von Fehlschlägen sein</li> <li>• Notwendige Kontrolle der Bestände zur Feststellung des Befallsbeginns sind aufwendig</li> <li>• Der Kostenaufwand ist häufig höher als bei der Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel</li> <li>• Einige Nutzorganismen können extreme Bedingungen nicht tolerieren</li> <li>• Die Kombination der Anwendung von Nutzorganismen mit chemischen Maßnahmen ist häufig schwierig</li> </ul>

### 3. 6. 4. 2 Nematophage Pilze

Bereits 1888 beschrieb der deutsche Botaniker Wilhelm Zopf das Fangen von Nematoden durch den Hyphomyceten *Arthrobotrys oligospora*, der zu diesem Zweck netzartige Schlingen ausbildet. Dieser Beobachtung wurde jedoch als wissenschaftliche Kuriosität lange Zeit kaum Aufmerksamkeit gewidmet, bis Charles Drechsler in den USA ab 1930 mit der tiefgründigen und systematischen Bearbeitung dieser Pilzgruppe begann.

Aufgrund der hohen Wirtsspezifität und dem obligaten Parasitismus hat man schon früh Versuche unternommen, nematophage Pilze zur Eindämmung der pflanzenparasitären Nematoden zu verwenden und die Parasit-Wirt-Beziehungen jeweils näher zu untersuchen.

Nematophage Pilze kommen sehr häufig in natürlichen Böden, in Ackerböden und in verrottendem organischen Material vor (Barron 1977; Dowe 1987; Krieg und Franz 1989; Rubner und Bernitzky 1992).

Die nematophagen Pilze können nach ihrer Art, Nematoden anzugreifen, in räuberische Pilze und endoparasitäre Pilze eingeteilt werden (z. B. Barron 1977; Dowe 1987; Rubner und Bernitzky 1992), wobei bei genauer Betrachtung des Tötungsmechanismus die Grenze zwischen den beiden Gruppen fließend ist. Wainwright (1995) stellt daneben noch Pilze, die die unbeweglichen Nematodeneier und Weibchen parasitieren.

Die Mehrheit der nematophagen Pilze befällt im Boden Nematoden in beweglichen Entwicklungsstadien (Larven und frei lebende adulte Nematoden).

Es sind etwa 150 Arten dieser nematophagen Pilze an beweglichen Nematodenstadien bekannt, von denen etwa 100 Arten räuberisch und etwa 50 Arten endoparasitär leben (Dürschner 1983; Dürschner und Weischer 1983; Wyss und Voß 1986; Dowe 1987; Alam 1990).

Die **räuberischen oder nematodenfangenden Pilze** sind mit speziellen Fangorganen ausgestattet, mit deren Hilfe sie die Nematoden festhalten und penetrieren (Abb. 3. 12). Innerhalb des Pilzsystems lassen sie sich den Klassen Zygomycetes, Basidiomycetes und Deuteromycetes zuordnen (Dowe 1987).

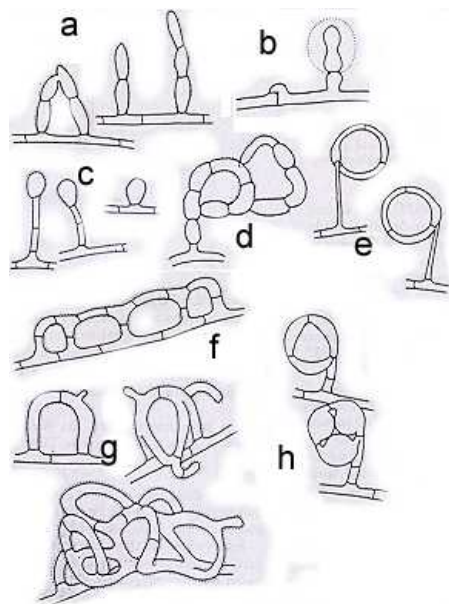


Abb. 3. 12 Fangorgane räuberischer Pilze.  
(nach Barron 1977; Dowe 1987, verändert)

Die einfachsten Fangorgane sind vegetative Hyphen, die ganz oder teilweise mit einer klebrigen Substanz überzogen sind (z. B. bei den Arten *Tridentaria implicans* oder *Tripasporina aphanopaga*).

Etwas aufwendiger sind klebrige Fangfortsätze gestaltet, die z. B. in der Gattung *Dactylella* oder *Monacrosporium* vorkommen (Abb. 3. 12 a)

Klebrige Fangknoten sitzen entweder direkt auf den Hyphen (Abb. 3. 12 b, d), oder auf einem Stiel (Abb. 3. 12 c). Durch Aneinanderreihung mehrerer Fangknoten können einfache Netze und Ringe entstehen. Als Beispiel für die Ausbildung klebriger Fangknoten seinen Pilze der Gattung *Monacrosporium* genannt.

Nicht klebrig sind die kontrahierbaren (Abb. 3. 12 h) und nicht kontrahierbaren Fangringe (Abb. 3. 12 e), in denen sich die Nematoden verfangen. Die Ringe reißen beim Befreiungsversuch des Nematoden ab und werden bis zu dessen Tötung mitgeschleppt. Angeregt durch den Nematoden, dehnen sich die Zellen der kontrahier-



baren Ringe stark aus und erdrosseln den Nematoden. Die Fangringe kommen nur bei den Deuteromycetes vor, z. B. bei *Monacrosporium* oder *Arthrobotrys*.

Den effektivsten Fangmechanismus stellen die klebrigen Fangnetze dar, die ebenfalls nur bei den Deuteromycetes vorkommen. Beispiele für Vertreter stammen z. B. aus den Gattungen *Arthrobotrys*, *Dactylaria* oder *Monacrosporium*. Die Fangnetze können eine einfache Leiterstruktur (Abb. 3. 12 f) oder ein kompliziertes dreidimensionales Netzwerk (Abb. 3. 12 g) bilden (Decker 1969; Barron 1977; Dürschner 1983; Dürschner und Weischer 1983; Dowe 1987; Gray 1988; Alam 1990; Wyss und Voß 1996).

Die Bildung der Fangorgane wird durch viele Faktoren beeinflusst. Neben Umweltfaktoren wie z. B. Feuchtigkeit, Temperatur, pH oder Nährstoffversorgung spielt auch die Anwesenheit von Nematoden eine Rolle. Kohlendioxid kann nach Meinung einiger Autoren anziehend auf Nematoden wirken und die Fallenbildung auslösen. Ähnliches wurde auch von organischem Material wie z. B. Blutserum, Regenwurmextrakt oder Dungextrakten beobachtet. Karotinoiden Pigmenten, Terpenen oder Gerbsäuren/Tanninen wird ebenfalls eine Wirkung zugeschrieben (Lysek und Nordbring-Hertz 1983; Dowe 1987; Gray 1988; Krieg und Franz 1989). In manchen Fällen kann die Bildung der Fangorgane von der Art der verfügbaren Nährstoffe abhängen. Bereits 1968 fand Cooke, daß ein Überangebot von organischem Material im Boden (überwiegend Kohlenstoffquellen) und ein Mangel an Stickstoffverbindungen zur vermehrten Fangorganbildung führen. Eine ähnliche Abhängigkeit vom Nährstoffangebot im Boden beschreiben auch Rubner und Bernitzky (1982).

Nach dem Fangen des Nematoden kommt es zu einer Erkennungsreaktion in Form einer Lektin-Kohlenhydrat-Bindung. Die Nematodenkutikula enthält das Kohlenhydrat N-Acetyl-Galactosamin, das sich mit einem Protein (Lektin) in der Klebsubstanz der Fangorgane verbindet. Diese Bindung gibt wahrscheinlich das Signal zur weiteren Parasitierung (Mankau 1980 a, 1980 b; Wyss und Voss 1986; Dowe 1987; Nordbring-Hertz 1988; Jansson und Nordbring-Hertz 1988; Lysek und Nordbring-Hertz 1988; Dackmann *et al.* 1992; Tunlid *et al.* 1992; Mier und Roth 1997).

Von der Kontaktstelle dringen die Pilze sehr schnell mit Hilfe sogenannter Penetrationshyphen durch die Nematodenkutikula in den Nematodenkörper ein. Ob das Durchdringen der Nematodenkutikula mechanisch und/oder enzymatisch erfolgt, ist noch nicht bekannt. Im Innern des Nematoden bildet sich ein knotenförmiger Infektionsbulbus, von dem aus Ernährungshyphen den ganzen Nematodenkörper durchziehen. Der Nematode ist zu diesem Zeitpunkt bereits abgetötet. Enzymatisch wird das ganze Körperinnere des Nematoden verdaut. Der Pilz nutzt die aufgenommenen Nährstoffe für das weitere Hyphenwachstum oder die Bildung von Konidien bzw. Dauersporen (Chlamydosporen). Zurück bleibt die leere, unverdauliche Nematodenhülle.

Die räuberische Aktivität einzelner Pilzarten steht im Zusammenhang mit seinen saprophytischen Fähigkeiten. Sie ist um so größer, je schlechter der Pilz saprophytisch im Boden überleben kann (Decker 1969; Barron 1977; Goldstein *et al.* 1980; Jansson und Nordbring-Hertz 1980; Mankau 1980 a, 1980 b; Lysek und Nordbring-Hertz 1983; Wyss und Voß 1986; Dowe 1987; Gray 1988; Nordbring-Hertz 1988; Jansson und Nordbring-Hertz 1988; Dackmann *et al.* 1992; Tunlid *et al.* 1992; Mier und Roth 1997).

Den räuberischen Pilzen sehr ähnlich, aber weniger intensiv untersucht, sind die **endoparasitären Pilze**, die ihren Nematodenwirt mit Hilfe spezieller Sporen infizieren. Endoparasitäre Pilze finden sich innerhalb der Klasse der einfachen Chytridiomycetes ebenso wie unter den Oomycetes, Zygomycetes, Deuteromycetes und den hoch entwickelten Basidiomycetes. Die Konidien dieser taxonomisch sehr heterogenen Pilzgruppe sind meist wesentlich kleiner und schlanker als die der räuberischen Arten. Sie können daher nur relativ wenige Reservestoffe speichern, deren Energie nur zur Schaffung einer neuen Startbasis im Wirtstier ausreicht. Endoparasitäre Pilze bilden im Gegensatz zu den räuberischen häufig kein Myzel im Boden (Dowe 1987).

Insgesamt kommen vier Infektionsarten endoparasitärer Pilze an beweglichen Nematodenstadien vor:

Bei der oralen Aufnahme nicht klebriger Infektionssporen erfolgt die Infektion passiv bei der Nahrungsaufnahme. Als Beispiel für diesen Infektionsweg ist *Harposporium anguillulae* zu nennen. Da die Sporen das enge Lumen des Mundstachels mundstacheltragender bzw. phytopathogener Nematoden nicht passieren können, stellen sie für diese Nematoden auch keine Gefahr dar.

Auf ähnliche Weise wie bei den Fangorganen der räuberischen Pilze erfolgt die Infektion durch klebrige Sporen bei den endoparasitären Pilzen. Bei diesem am häufigsten unter den endoparasitären Pilzen auftretenden Infektionsmechanismus werden klebrige Sporen gebildet, die bei Kontakt mit den wandernden Nematoden im Boden an der Nematodenkutikula haften bleiben und einen Keimschlauch in den Nematodenkörper treiben. Auch der in dieser Arbeit verwendete Pilz ***Hirsutella rhossiliensis*** gehört in diese Gruppe (s. 3. 7).

Bestimmte niedere endoparasitäre Pilze wie z. B. Pilze der Gattung *Catenaria* oder *Myzocyttium* bewegen sich mit Hilfe von begeißelten Schwärmsporen (Zoosporen) einem chemischen Gradienten der Nematodenexsudate folgend auf die Nematoden zu, enzystieren an der Nematodenkutikula und durchdringen sie.

Bestimmte Pilzarten der Gattung *Haptoglossa* bilden Injektionssporen, die bei Berührung mit Nematoden in weniger als einer Sekunde ihren infektiösen Plasmainhalt durch die Nematodenkutikula in den Nematodenkörper schießen.

Neben den räuberischen und den endoparasitären Pilzen, die bewegliche Nematodenstadien befallen, gibt es auch solche, die die unbeweglichen Eier und Weibchen

infizieren. Da sie nur von untergeordneter Bedeutung sind, seien hier nur *Verticillium lecanii* und *V. chlamydosporium* als Eiparasiten und *Catenaria auxiliaris* und *Nematophthora gynophila* als Parasiten von Weibchen genannt (Decker 1969; Barron 1977; Goldstein *et al.* 1980; Jansson und Nordbring-Hertz 1980; Kerry 1980; Mankau 1980 a, 1980 b; Dürschner 1983; Dürschner und Weischer 1983; Lysek und Nordbring-Hertz 1983; Jatala 1986; Wyss und Voß 1986; Dowe 1987; Gray 1988; Kerry 1988; Nordbring-Hertz 1988; Jansson und Nordbring-Hertz 1988; Alam 1990; Saxena *et al.* 1991; Stirling 1991; Dackmann *et al.* 1992; Tunlid *et al.* 1992; Dijksterhuis *et al.* 1994; Mier und Roth 1997).

#### 3. 6. 4. 3 Einsatz von Pilzen zur Nematodenbekämpfung

Obwohl die nematophagen Pilze nach ihrer Entdeckung anfangs als wissenschaftliche Kuriosität abgetan wurden (s. 3. 7. 4. 2), hat man schon früh Versuche unternommen, diese Pilze zur Bekämpfung von Nematoden einzusetzen. Die potentielle Möglichkeit eines Einsatzes der nematophagen Pilze zur biologischen Nematodenbekämpfung wird bis heute immer wieder herausgestellt.

Die ersten Versuche wurden 1937 von Linford *et al.* auf Hawaii und 1941 von Roubaud in Paris durchgeführt. Das erste kommerzielle Produkt („Royal 350“) bestand aus myzelisierten Roggenkörnern von *Arthrobotrys irregularis* und wurde 1977/78 zwar mit einem gewissen Erfolg zur Bekämpfung von *Meloidogyne spp.* an Tomaten in Südfrankreich eingesetzt, die erforderliche Aufwandmenge war jedoch viel zu hoch. Ein anderes Produkt („Royal 300“) enthielt *Arthrobotrys robusta* und diente zur Bekämpfung des in Champignonkulturen vorkommenden Nematoden *Ditylenchus myceliophagus*. Eine generelle gute Wirkung haben aber beide Produkte nie bewiesen (Cayrol und Frankowski 1980; Müller und Zimmermann 1985; Krieg und Franz 1989). Hauptproblem beim Einsatz nematophager Pilze ist neben der Anzucht und der erfolgreichen Etablierung im Boden die Wirkungssicherheit der Pilze. Die Verringerung des Nematodenbefalls schwankt sehr stark und gelingt selten bis unter die Schadensschwelle (Kerry 1987; Stirling 1988 a, 1991; Sikora 1992 b; Kerry 1990 a, 1998; Kerry und Hominick 1999).

Bereits die Anzucht und Massenproduktion der nematophagen Pilze bereitet häufig große Probleme. Die wirksamsten Pilze sind die obligaten Parasiten, die sich nur schwer oder garnicht auf künstlichen Medien anziehen lassen. Da eine Vergrößerung der saprophytischen Fähigkeiten in der Regel mit einer Verringerung des antagonistischen Potentials einhergeht, lassen sich ausgerechnet die Pilze auf künstlichen Medien in Massen gut anziehen, deren Wirkung nicht garantiert und starken Schwankungen unterworfen ist (Dürschner 1983; Mankau 1980 b; Jatala 1986; Wyss

und Voß 1986; Dowe 1987; Kerry 1989, 1990 b; Stirling 1991; Kerry 1993; Kerry und Hominick 1999).

Grund für die ausbleibende Wirkung der nematophagen Pilze ist häufig, daß die freien, ungeschützten Organismen sich nicht in den Boden einführen lassen und sich dort auch nicht etablieren. Diese Verhinderung des Pilzwachstums durch endogene oder exogene Faktoren wird als Fungistasis bezeichnet (Aust *et al.* 1993). Stoffwechselprodukte der bereits vorhandenen Organismen und die Konkurrenz um Nährstoffe im Boden tragen zur Fungistasis bei (Cooke 1964; Wyss und Voß 1986; Dowe 1987; Kerry 1987; Stirling 1988 a, 1991; Kerry 1993;).

Zwar können auch Substrate zusammen mit den nematophagen Pilzen in den Boden eingearbeitet werden, die dem Pilz zum einen eine gute Nährstoffbasis bieten, jedoch auch das Wachstum der bereits etablierten Mikroorganismen fördern. Als schwache Saprophyten können sich die nematophagen Pilze dann in Gegenwart der noch gestärkten Konkurrenz nicht etablieren (Stirling 1988 a; Kerry 1989; Stirling 1991; Kerry 1993; Stirling *et al.* 1998 a; Kerry und Hominick 1999).

Bisher fehlen für die erfolgreiche Applikation nematophager Pilze geeignete Formulierungstechniken und Formulierungen, die neben dem Schutz der Pilze auch deren Lagerung und kontrollierte Freisetzung ermöglichen, weshalb zur Zeit auch keine wirksamen Präparate auf dem Markt sind (Kerry 1987; Stirling 1988 a, 1991; Sikora 1992 a; Stirling und Mani 1995; Kerry und Evans 1996; Siddiqui und Mahmood 1996; Patel 1998; Stirling und Smith 1998; Stirling *et al.* 1998 a; Whitehead 1998).

### 3. 7 Der nematophage Pilz *Hirsutella rhossiliensis*

Trotz der großen Probleme beim Einsatz nematophager Pilze (s. 3. 5. 5. 2) wird einigen Spezies dennoch das Potential zu einer erfolgreichen biologischen Nematodenbekämpfung zugeschrieben (Dowe 1987; Jaffee und Muldoon 1997; Davies 1998). Zu diesen Organismen gehört auch der erst 1980 von Minter und Brady beschriebene und im gleichen Jahr von Sturhan und Schneider als Nematodenparasit erkannte Hyphomycet *Hirsutella rhossiliensis* (Deuteromycota). Sturhan und Schneider (1980) beschreiben den Pilz zwar als *Hirsutella heteroderae*, dieser ist aber identisch mit *Hirsutella rhossiliensis* (Jaffee und Muldoon 1989).

Der ubiquitäre Pilz *H. rhossiliensis* parasitiert eine Vielzahl pflanzenparasitärer Nematoden, hauptsächlich aber Nematoden der Gattung *Heterodera* und verschiedene *Meloidogyne*-Arten, die gerade in den gemäßigten Breiten zu großen Schäden an Kulturpflanzen führen. Nicht als Wirte geeignet sind Dorylaimiden und Plectiden (s. 3. 3; Sturhan und Schneider 1980; Jaffee und Zehr 1982; Jaffee *et al.* 1989; Velvis und Kamp 1995; Cayrol *et al.* 1986; Dowe 1987).

Der sehr einfache Lebenszyklus von *H. rhossiliensis* ist nur auf das Parasitieren von Nematoden ausgerichtet. Ferner sind ausschließlich ungeschlechtliche Stadien bekannt (Jaffee *et al.* 1990; Jaffee und Muldoon 1997). Die Pathogenität verschiedener Isolate ist sehr ähnlich (Tedford *et al.* 1994). Im Gegensatz zu Jaffee und Zehr (1985) ist *H. rhossiliensis* kein obligater Parasit, da er sich auf Grund seiner schwachen saprophytischen Fähigkeiten auch auf künstlichen Medien anziehen läßt (Sturhan und Schneider 1980; Patel 1998; s. u.).

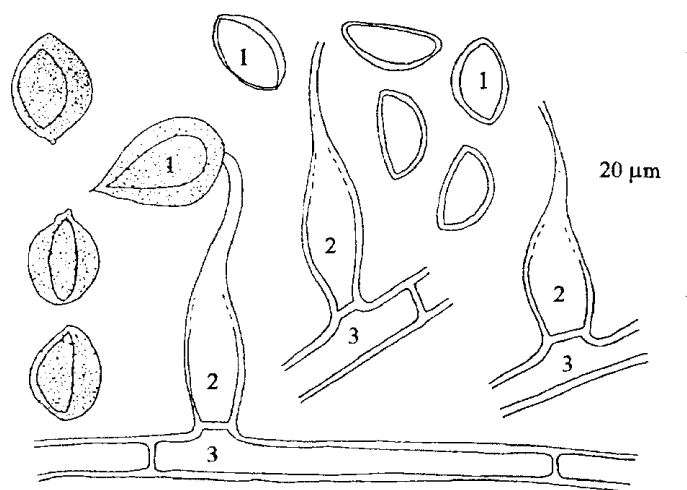


Abb. 3. 13 Morphologie von *Hirsutella rhossiliensis* (1 Konidien, 2 Phialiden, 3 Hyphen; Minter und Brady 1980).

Die Morphologie von *H. rhossiliensis* ist in Abb. 3.13 gezeigt. Die hyalinen Hyphen des Luftmyzels (3) sind etwa 2,5 bis 4 µm breit. Von den Hyphen (3) stehen im

rechten Winkel die flaschenförmigen Phialiden (2) ab, die an ihrer Spitze ovale bis ellipsoide Konidiosporen (1) tragen. Die Konidiosporen werden nur vom Luftmyzel gebildet, bei der Anzucht in Flüssigkultur fehlen sie. Die klebrigen Sporen haften bei Berührung eines Nematoden an dessen Kutikula und werden durch die weitere Wanderungsbewegung des Nematoden von den Phialiden abgelöst. Innerhalb von zwölf Stunden wächst aus der Spore ein Keimschlauch in den Körper des Nematoden. Es bildet sich ein Infektionsbulbus, von dem aus schon sehr schnell Assimilationshyphen den ganzen Nematodenkörper durchziehen, was nach spätestens drei Tagen zum Tod des Nematoden führt. Der Pilz bricht nach Assimilation des gesamten Körperinnern an mehreren Stellen aus dem Nematoden aus und bildet wieder neues Myzel mit Phialiden und Sporen im Boden. Zurück bleibt die leere Nematodenhülle (Minter und Brady 1980; Sturhan und Schneider 1980; Kerry und Jaffee 1997).

Die für eine Nematodenbekämpfung wichtige Sporulation des Pilzes findet bei Temperaturen zwischen 10 und 25 °C und einem pH-Wert zwischen 5,5 und 7,0 statt (Jaffee und Zehr 1983). Die Sporulation ist ferner abhängig von der Textur und Feuchte des Bodens (McInnis und Jaffee 1989; Jaffee *et al.* 1990; Tedford *et al.* 1992). Die Sporen haften nicht spezifisch an der Nematodenkutikula, sondern auch an Glas, Plastik oder Bodenpartikeln (McInnis und Jaffee 1989). Abgelöste Sporen keimen zwar aus, die gebildeten Hyphen sind jedoch nicht lange lebensfähig (Jaffee und Zehr 1985; McInnis und Jaffee 1989; Velvis und Kamp 1995). Da die Sporen sehr empfindlich und nach dem Ablösen von den Phialiden nicht mehr infektiös sind, ist ein Einsatz einer Formulierung mit Sporen wie bei dem Dauersporenbildner *Verticillium chlamydosporium* nicht möglich (Kerry *et al.* 1993).

Für einen Einsatz muß *H. rhossiliensis* in den Boden eingebracht und etabliert werden, damit im Boden gebildetes Myzel und Phialiden mit infektiösen Sporen vorhanden sind. Als schwachem Saprophyten sollten dem Pilz in der bereits geforderten Formulierung Nährstoffe mitgegeben werden, die nur *H. rhossiliensis* zur Verfügung stehen (s. 3. 6. 4. 3).

Erste Versuche zum Einsatz von in Calciumalginat-Kugeln verkapseltem *H. rhossiliensis* wurden bereits durchgeführt, zeigten aber auch die unter 3. 6. 4. 3 bereits erwähnten Probleme (Lackey *et al.* 1993; Jaffee und Muldoon 1995; Jaffee *et al.* 1995, 1996).

Die Anzucht von *H. rhossiliensis* wurde bisher wenig systematisch untersucht, alle Autoren verwendeten in der Regel Vollmedien, meist unter Zusatz von Hefeextrakt. Fermentationen mit *H. rhossiliensis* wurden noch nicht durchgeführt. Sturhan und Schneider stellten 1980 fest, daß sich der Pilz auf künstlichen Komplexmedien zwar anziehen läßt, aber auf Grund seiner schwachen saprophytischen Fähigkeiten nur ein sehr langsames Wachstum zeigt. Aus dem Jahr 1959 existieren von McLoed zwei ältere Arbeiten zur Ernährung der Gattung *Hirsutella*. Die erste Arbeit (McLoed

1959 a) beschäftigt sich mit grundlegenden Fragen von Medienzusammensetzungen und der erforderlichen Größe des Inokulums. Dabei wurde festgestellt, daß anorganische Stickstoffquellen wie z. B. Kaliumnitrat ( $\text{KNO}_3$ ) oder Ammoniumnitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) nicht zur Anzucht geeignet sind. Das erste für eine Anzucht mit guten Ausbeuten geeignete Flüssigmedium enthielt 1,5 % (w/w) Hefeextrakt, 2 % (w/w) Glucose und hatte einen pH-Wert von 6,0. Für die Größe des Inokulums werden 0,4 % (w/w) TS angegeben, wobei ausdrücklich darauf hingewiesen wird, daß die Größe des Inokulums kaum Einfluß auf die Ausbeute hat, sondern nur das anfängliche Wachstum beeinflusst. Genauere Untersuchungen der Ansprüche an die Stickstoffquelle zeigten, daß auch die Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Tyrosin, D,L-Asparaginsäure, L-Prolin, L-Arginin, L-Leucin und D,L- $\alpha$ -Alanin zur Anzucht geeignet sind (McLeod 1959 b). Eine mit Hefeextrakt vergleichbare Ausbeute wurde jedoch nur bei einer um acht Tage verlängerten Anzucht (insgesamt 20 Tage) und dem achtfachen Inokulum erreicht. Der Autor vermutet, daß im Hefeextrakt neben essentiellen Stickstoffquellen wichtige Wachstumsfaktoren enthalten sind, die durch das große Inokulum aus der Vorkultur in das neue Medium mit überführt werden. In weiteren Versuchen hat McLeod gezeigt, daß die Ausbeute auch von der Beschaffenheit des Inokulums abhängt. Kulturen, die mit feinem Myzel und kleinen Pellets angeimpft wurden, zeigten bessere Wachstumsverläufe als Kulturen, deren Inokulum aus großen Pilzpellets bestand.

Für die Anzuchttemperatur werden für verschiedene *H. rhossiliensis*-Isolate in der Literatur Optima zwischen 20 und 25 °C angegeben, während bei 30 °C bereits kein Wachstum mehr festgestellt werden kann, der pH-Wert liegt in der Regel ungefähr im neutralen Bereich bis leicht sauren Bereich (Jaffee und Zehr 1985; Tedford *et al.* 1995; Velvis und Kamp 1996).

### 3. 8            **Trocknung und Konservierung von Mikroorganismen**

Auf die Bedeutung der Formulierung wurde bereits unter 3. 1 hingewiesen. Die Formulierung sollte darüber hinaus auch die Konservierung und Lagerung der empfindlichen Organismen ermöglichen (Stirling 1988 a, 1991; Stirling und Mani 1995).

Für den Einsatz nematophager Pilze zur biologischen Nematodenbekämpfung sollten die Präparate in der landwirtschaftlichen Praxis bei Raumtemperatur einige Monate lagerfähig sein, die Konservierung sollte möglichst preiswert durch Trocknung erfolgen.

Eine Konservierung und Lagerung von Organismen ist jedoch nur möglich, wenn diese ihren Zellstoffwechsel reversibel auf ein geringstes Maß reduziert haben (Anabiose). Eine spezielle Form der Anabiose stellt die Anhydrobiose dar, bei der Zellstoffwechsel durch das Fehlen von Wasser unterbunden wird (Crowe und Crowe 1992; Lievense und van't Riet 1994). Wasser dient in allen Organismen zur Aufrechterhaltung der Konformation und Funktion von Proteinen und Lipiden. Dies geschieht durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen und polaren Seitengruppen. Wasser dient weiterhin zum Aufbau des Zellurgors, ist Lösungsmittel für die Stoffwechseledukte und -produkte und nimmt selber an vielen Reaktionen teil, besonders an Kondensationen und Hydrolysen (Pirt 1975).

Ohne das lebensnotwendige Wasser können zahlreiche Schäden an den Zellen auftreten (Roser 1991; Crowe und Crowe 1992; Potts 1994):

Wesentlicher Bestandteil einer Zelle sind ihre Membranen. Sie sorgen für die Abgrenzung der Zelle nach außen und die Kompartimentierung innerer Zellorganellen wie Mitochondrien oder Liposomen. Die Membran dient dabei als Permeabilitätsbarriere und hält die wesentlichen Stoffwechseledukte und -produkte am Ort ihrer Umsetzung zurück. Die Membran besteht aus einer 4 bis 5 µm dicken Doppelschicht amphipolarer Lipide. Die Kopfregion der Lipide besitzt hydrophile Eigenschaften, während die Schwanzregion der Lipide aus hydrophoben Acylresten langkettiger Fettsäuren besteht. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen lagern sich die Schwanzregionen der Lipidmoleküle zusammen und schirmen sich vom wässrigen Zellmilieu ab. Da die Fettsäureketten jedoch nicht vollständig gesättigt sind, sind die Moleküle nicht linear, sondern weisen im Bereich der Doppelbindungen jeweils einen Knick von 30 Grad auf, was dazu führt, daß sich die Ketten nicht in gestreckter Form eng aneinander lagern und in die kristalline Phase übergehen können. Die Membranen verbleiben in einer flüssig-kristallinen Phase. Unterstützt wird dieser Zustand durch die starke Hydratisierung der polaren Kopfregionen der Moleküle, die auch für die Trennung unterschiedlicher Membranen sorgt. Fehlt dieses Wasser, kommt es zum regellosen Agglomerieren und Kristallisieren der Lipide, wobei sich auch unterschiedliche Membranen zusammenlagern und irreversibel geschädigt werden.



Bei einer Trocknung von Zellen wird auch den Proteinen und Enzymen das strukturgebende Wasser (s. o.) entzogen, was in der Regel zu einer irreversiblen Schädigung und einem Verlust ihrer Funktionsfähigkeit führt. Solche Konformationsänderungen sind z. B. für die irreversible Ausbildung neuer Disulfidbrücken verantwortlich. Neben den Membranen, den Proteinen und Enzymen ist auch das Genom von einer Schädigung durch Austrocknung bedroht. Auch hier fehlt das strukturgebende Wasser (s. o.), was zum Brechen von Nukleinsäureketten führen kann. Reduktions- und Oxidationsreaktionen, Alkylierungen und Cross-Linking können ebenfalls zu erheblichen Mutationen führen, zumal auch die Reparaturmechanismen in Folge der Austrocknung nicht mehr funktionieren.

Eine weitere Gefahr für die Zellen besteht im Verlauf der Austrocknung durch die Aufkonzentrierung der in der Zelle gelösten Substanzen und Salze, die dadurch toxische Konzentrationen erreichen können.

Eine Möglichkeit, Zellen vor Schäden durch Austrocknung zu schützen, stammt aus der Natur selber. Beobachtungen an Organismen, die eine Austrocknung problemlos überleben, haben gezeigt, daß diese Zellen bei fortschreitender Anhydrobiose zum Ersatz des strukturgebenden Wassers das Disaccharid Trehalose akkumulieren. Bei höheren Pflanzen wurde statt Trehalose auch Saccharose gefunden (Csonka 1989; Green und Angell 1989; Roser 1991; Crowe und Crowe 1992; Potts 1994; Leslie *et al.* 1995).

Neben dem Zusatz von Trehalose kann die Überlebensrate auch durch Aktivkohle, die aufkonzentrierte toxische Substanzen aus den Zellen und reaktive Sauerstoffradikale adsorbiert, Magermilch, Honig, Inosit oder Prolin erhöht werden. Eine langsame Trocknung bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck und die Lagerung in Abwesenheit von Sauerstoff erhöhen zusätzlich die Überlebensraten. Eine Restfeuchtigkeit von etwa 5 % gewährleistet, daß auch ohne Zusätze die Konformation biologischer Makromoleküle erhalten bleibt, da den Zellen noch genügend Wasser zur Stabilisierung von Makromolekülen zur Verfügung steht (Hoffmann 1999).

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Materialien

#### 4.1.1 Sulfoethylcellulose (SEC)

Die in dieser Arbeit zur Verkapselung des nematophagen Pilzes *Hirsutella rhossiliensis* verwendeten Polyelektrolyt-Hohlkugeln werden durch Eintropfen einer Lösung eines Polyanions in die Lösung eines Polykations gebildet (Symplex-Fällung). Als Polyanion wurde in dieser Arbeit Sulfoethylcellulose (SEC) verwendet (Abb. 4. 1).

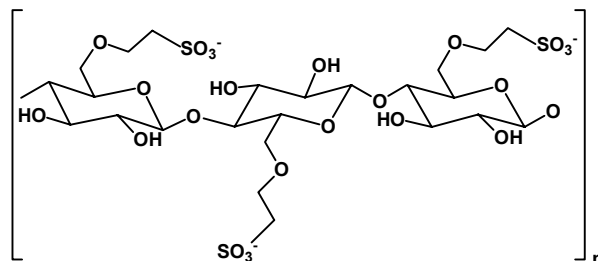


Abb. 4. 1. Strukturformel von Sulfoethylcellulose (Kettenausschnitt).

Technische SEC wurde als Natriumsalz von Fa. Wolff Walsrode (Bomlitz) zur Verfügung gestellt (Tab. 4. 1).

Tab. 4. 1. Physikalische Daten der verwendeten SEC (Thielking, 1998).

Substituti- onsgrad	Viskosität <sup>1)</sup>	Grenzvisko- sitätszahl <sup>2)</sup>	Mittlere Molmasse <sup>3)</sup>	gewichtete Molmasse <sup>3)</sup>	Feuchte
	mPa · s	ml · g <sup>-1</sup>	g · mol <sup>-1</sup>	g · mol <sup>-1</sup>	%
0,42	1.860	419	132.600	765.900	4,6

<sup>1)</sup> Viskosität einer 2 %igen wäßrigen Lösung bei 20 °C und 2,55 s<sup>-1</sup>.

<sup>2)</sup> Grenzviskositätszahl bei 25 °C in 0,1 molarer NaNO<sub>3</sub>-Lösung. (Charakteristische Kenngröße für gelöste Polymere, die die durch Extrapolation der Konzentration des Polymers gegen Null ermittelten Viskositätszahl (Staudinger-Index) darstellt.)

<sup>3)</sup> Bestimmt durch Größenausschlußchromatographie gegen Pullan.

Der feingeflockte Feststoff wurde in der entsprechenden Menge deion. Wasser unter Rühren (300 UpM) in ca. 24 h gelöst. Der jeweils für die Versuche gewünschte pH-Wert (meistens pH 6,0) wurde anschließend mit 2,5 molarer Natronlauge bzw. Salzsäure eingestellt.

#### 4. 1. 2 Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC)

Als kationische Bestandteile für den Polyelektrolytkomplex wurden technisches Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC, Abb. 4. 2) oder Chitosan (4. 1. 3) verwendet.

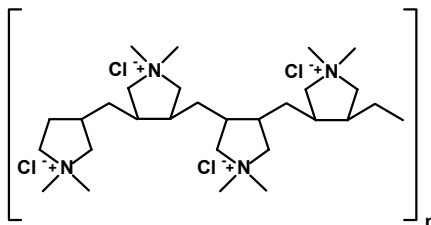


Abb. 4. 2 Strukturformel von Polydiallyldimethylammoniumchlorid (Kettenausschnitt).

PDADMAC Nr. 1 ist das Produkt *Praestol 187 K* der Fa. Stockhausen GmbH & Co. KG (Krefeld), Hersteller des PDADMAC Nr. 2 (*Magnafloc 368*) ist Fa. Allied Colloids GmbH (Hamburg) (Tab. 4. 2).

Tab. 4. 2 Physikalische Daten der verwendeten PDADMACs (Thielking, 1998).

Nr.	Aktivgehalt	Grenzviskositätszahl <sup>1)</sup>	mittlere Molmasse <sup>2)</sup>	gewichtete Molmasse <sup>2)</sup>
	%	ml · g <sup>-1</sup>	g · mol <sup>-1</sup>	g · mol <sup>-1</sup>
1	40,4	78,22	34.500	112.900
2	91,8	161,98	60.800	357.300

<sup>1)</sup> Grenzviskositätszahl bei 25 °C in 0,1 molarer NaNO<sub>3</sub>-Lösung.

<sup>2)</sup> Bestimmt durch Größenausschlußchromatographie gegen Pullan.

Zur Herstellung der Lösungen wurde der Feststoff in der entsprechenden Menge deion. Wasser unter Rühren (300 UpM) gelöst (Nr. 1) bzw. die konzentrierte Lösung mit der entsprechenden Menge deionisiertem Wasser unter Rühren (300 UpM) verdünnt (Nr. 2). Der pH-Wert wurde mit 2,5 molarer Natronlauge bzw. Salzsäure auf 3,5 eingestellt. Die Lösungen von PDADMAC Nr. 2 wurden zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile bei 10 mbar durch einen Schwarzbandfilter abgenutscht.

Zur Herstellung von Pilzkapseln (s. 4. 7) wurde ausschließlich PDADMAC Nr. 1 verwendet.

### 4. 1. 3 Chitosan

Neben PDADMAC (4. 1. 2) wurde auch Chitosan (Poly- $[\beta$ -(1,4)-2-amino-2-desoxy-D-glucopyranose], Abb. 4. 3) als Polykation verwendet. Sowohl das technische Chitosan Nr. 1 (Tab. 4. 3) als auch das lebensmittelgeeignete Chitosan Nr. 2 (Tab. 4. 4) stammte von Fa. Primex Ingredients AS Avaldnes, Norwegen.

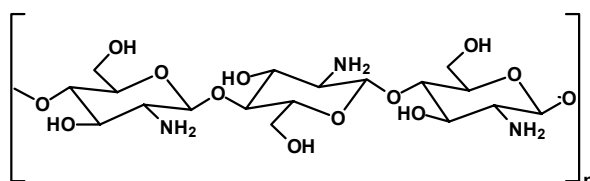


Abb. 4. 3 Strukturformel von Chitosan (Kettenausschnitt).

Zur Herstellung der Lösungen wurde der Feststoff in der entsprechenden Menge 1 %iger Essigsäure unter Rühren (300 - 1100 UpM) gelöst und zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile bei 10 mbar durch einen Schwarzbandfilter abgenutscht.

Bei der Kapselherstellung aus SEC und Chitosan wurden die pH-Werte beider Lösungen, falls nicht anders angegeben, mit 2,5 molarer Natronlauge bzw. Salzsäure auf pH 3,5 eingestellt.

Tab. 4. 3 Physikalische Daten und Herstellerangaben des verwendeten Chitosan Nr. 1.

<b>Hersteller</b>	Fa. Primex Ingredients AS, Avaldnes, Norwegen
<b>Produkt</b>	Fine grade chitosan made from fresh shrimp shells
<b>Charge</b>	TM 578
<b>Trockensubstanz</b>	96,0 %
<b>Aschegehalt</b>	0,1 %
<b>Deacetylierungsgrad</b>	87,7 %
<b>Löslichkeit</b>	(in 1 %iger Essigsäure) 99,9 %
<b>Viskosität<sup>1)</sup></b>	(in 1 %iger Essigsäure) 33 mPa·s
<b>mittlere Molmasse<sup>2)</sup></b>	6.000 g · mol <sup>-1</sup>
<b>Gewichtete Molmasse<sup>2)</sup></b>	9.000 g · mol <sup>-1</sup>
<b>Recovery<sup>3)</sup></b>	74 %

<sup>1)</sup> Brookfield LVT Viskosimeter bei 25 °C und 30 UpM gemessen.

<sup>2)</sup> Bestimmt durch Größenausschlußchromatographie gegen Pullan (Thielking 1998).

<sup>3)</sup> Bezeichnet die Wiederfindungsrate nach der Messung. Niedrige Wiederfindungsraten ergeben sich durch Verunreinigungen (Thielking 1998).

Tab. 4. 4 Herstellerangaben zum Chitosan Nr. 2.

<b>Hersteller</b>	Fa. Primex Ingredients AS, Avaldnes, Norwegen
<b>Produkt</b>	Chitosan Food Grade 85
<b>Charge</b>	BN 353
<b>Trockensubstanz</b>	91,6 %
<b>Aschegehalt</b>	0,3 %
<b>Deacetylierungsgrad</b>	88,0 %
<b>Löslichkeit</b>	(in 1 %iger Essigsäure) > 98 %
<b>Viskosität<sup>1)</sup></b>	(in 1 %iger Essigsäure) 32 mPa·s

<sup>1)</sup> Brookfield LVT Viskosimeter bei 25 °C und 30 UpM gemessen.

## 4. 2            Optimierung der mechanischen Stabilität

Zur Herstellung der Kapseln wurden jeweils 10 ml der wäßrigen Polyanionenlösung (SEC, ggf. mit Zusätzen) mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle ( $\varnothing$  1,2 mm) bei Raumtemperatur in 200 ml der entsprechenden wäßrigen Lösung des Polykations (PDADMAC oder Chitosan) getropft. Für die Vernetzerlösung wurde ein 250 ml Becherglas (hohe Form) verwendet. Die Rührgeschwindigkeit (Länge des Rührkerns 2,5 cm) betrug in Abhängigkeit von der Viskosität der Polykationenlösung ca. 150 – 1100 UpM (meist 300 – 700 UpM). Die Fallhöhe zwischen Kanülenspitze und der Oberfläche des Vernetzerbades wurde durch Einspannen der Spritze in ein Stativ auf 10 cm eingestellt.

Die Vernetzungsdauer, d. h. die Zeit, die die Kugeln nach dem vollständigen Eintropfen der Polyanionenlösung noch im Vernetzterbad bleiben, ist für die Stabilität von großem Einfluß. Bei langer Verweilzeit in der Vernetzerlösung beginnen die Kapseln in den meisten Fällen zu schrumpfen. Wie Vorversuche gezeigt haben, besitzen die Kugeln kurz vor dem Schrumpfungsbeginn ihre höchste Stabilität. Deshalb verblieben die Kugeln im Vernetzterbad bis sich die Schrumpfung andeutete, jedoch maximal 60 Minuten, wenn keine Schrumpfung erfolgte.

Nach dem Abtrennen mit einem Metallsieb (Maschenweite 500  $\mu$ m) wurden die Kugeln ca. 5 Minuten in 200 ml deionisiertem Wasser bzw. 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Kugeln bis zur Messung der mechanischen Kapselstabilität (s. 4. 3) bei 8 °C in 50 ml deion. Wasser oder 0,9 %iger (physiologischer) NaCl-Lösung gelagert.

Zur Herstellung größerer Kapselmengen und von Kapseln verschiedener Größe wurde die Polyanionenlösung mit einer Eintropfapparatur (Eigenbau, Abb. 4. 9, 4. 6. 2) eingetropft.

### 4. 3 Messung der mechanischen Kapselstabilität

Als Maß für die mechanische Stabilität einer Kapsel wurde die Kraft verwendet, die aufgewendet werden muß, um die Kugel zum Zerplatzen zu bringen. Dazu wurden die Hohlkugeln mit einem Metallspatel auf einem Stempel bis zum Platzen zusammengedrückt (Abb. 4. 4). Der Stempel ist mit einer Kraftmeßdose (K) verbunden, die die Meßwerte über einen Meßwertverstärker auf einem Schreiber ausgibt. Die Meßbereiche lagen je nach mechanischer Stabilität der Hohlkugeln zwischen 500 mV und 5 V. Die Papiervorschubsgeschwindigkeit wurde auf 6 cm/min eingestellt.

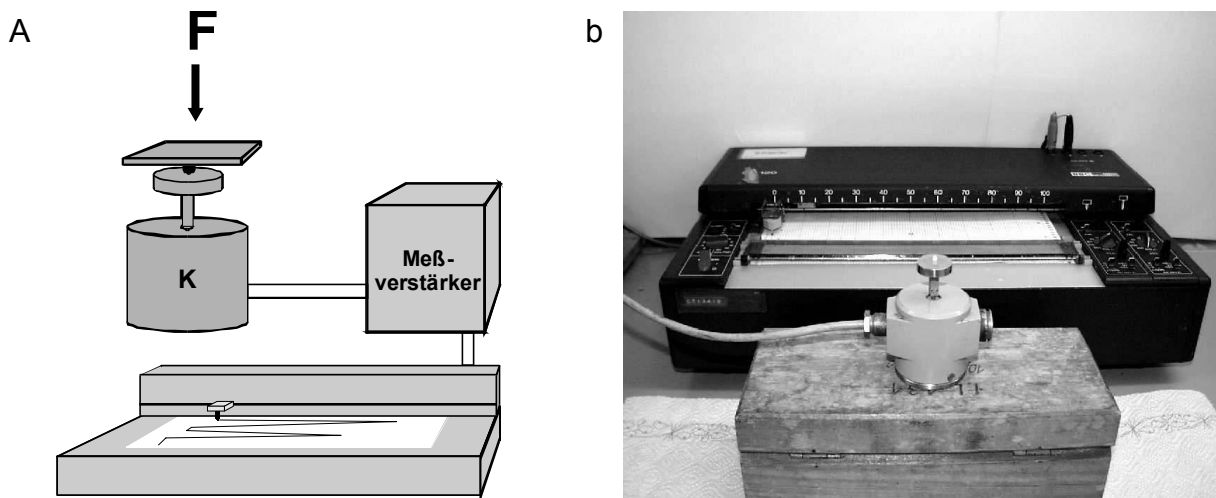


Abb. 4. 4 Bestimmung der mechanischen Kapselstabilität  
(K Kraftmeßdose, F Kraft).

Zum Kalibrieren der Meßapparatur wurde durch Auflegen eines Gewichtes (z. B. 200 g) der Zusammenhang zwischen der vom Schreiber aufgezeichneten Spannung und der auf den Stempel wirkenden Kraft (F) hergestellt. Eine Kalibrierung erfolgte sowohl bei jeder Inbetriebnahme als auch bei jedem Wechsel des Meßbereichs.

Die mechanische Stabilität der Hohlkugeln wurde für die jeweilige Kapselsorte nach 24stündiger Lagerung in der entsprechenden Lagerungslösung gemessen. Die Kugeln wurden in der entsprechenden Lagerungslösung zur Meßapparatur gebracht, dort mit einem Spatel zum Entfernen der anhaftenden Lagerungslösung auf ein Papiertuch gelegt und dann nacheinander auf dem Stempel mit einem Metallspatel zum Platzen gebracht. Aus der vom Schreiber aufgezeichneten Spannung wurde die aufgebrachte Kraft ermittelt. Von jeder Kapselsorte wurde die mechanische Stabilität von ca. 10-15 Kapseln gemessen.

Die mechanischen Stabilitäten wurden gemittelt und die Standard-Abweichung bestimmt:

$$\sigma = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}} \quad (4. 1)$$

$\sigma$  = Standardabweichung  
 $n$  = Anzahl der Meßwerte  
 $x$  = Meßwert

Die Standardabweichung stellt die Wendepunkte der Gauß'schen Normalverteilungskurve dar. 68 % der gemessenen mechanischen Kapselstabilitäten liegen dabei im Intervall  $2 \cdot \sigma$ .



#### 4. 4 Anzucht von *Hirsutella rhossiliensis*

##### 4. 4. 1 Isolierung und Stammhaltung

Der nematophage Pilz *Hirsutella rhossiliensis* wurde 1985 an der Biologischen Bundesanstalt (BBA) am Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde in Münster aus infizierten Larven des phytopathogenen Nematoden *Heterodera schachtii* isoliert. Die Nematodenlarven stammten aus Bodenproben, die Freiland-Kleinparzellen entnommen wurden, auf denen zuvor nematodenanfällige Zuckerrübensorten angebaut wurden (Müller 1985). Die Isolierung des Pilzes erfolgte nach der „Sprinkling Technique“ (Barron 1977), bei der die feingesiebten Bodenproben auf mit oberflächensterilisierten *H. schachtii* Larven inokulierten Wasseragarplatten verteilt wurden, oder nach der „Zentrifugationsmethode“ (Dürschner 1983; Dürschner und Weischer 1983), bei der die Pilzsporen mit Wasser aus der Bodenprobe ausgewaschen und zentrifugiert wurden, bevor auch sie auf entsprechend inokulierte Wasseragarplatten verteilt wurden. Mit *H. rhossiliensis* infizierte *H. schachtii* Larven wurden auf neue Wasseragarplatten ausgelegt und der auswachsende Pilz durch Ausstanzen mit einem Korkbohrer erneut überführt.

Um eine eventuelle Abnahme der Pathogenität durch häufiges Überimpfen auf künstliche Medien zu unterbinden, wurde der Pilz zweimal im Jahr auf mit *H. schachtii* Larven inokulierte Wasseragarplatten überführt und der auswachsende Pilz reisoliert (Gutberlet 2000).

Alle Medien in dieser Arbeit wurden unter Verwendung von deion. Wasser mit einer Restleitfähigkeit < 5 µS angesetzt.

Für die Stammhaltung von *H. rhossiliensis* wurde in dieser Arbeit ein modifizierter Glucose-Nutrient-Agar (GNA) verwendet (Tab. 4. 5).

Tab. 4. 5 Zusammensetzung des Glucose-Nutrient-Agars (GNA).

Medienbestandteil	% (w/w)
Glucose	2
Hefeextrakt	1,5
Agar-Agar	1,5
Streptomycin	0,0025
Penicillin	0,0025
deion. Wasser	94,995

Für 20 Petrischalen (Ø 85 mm, mit Nocken) wurden in einer 1 l-Flasche 7,5 g granulierter Hefeextrakt (Merck, Darmstadt) und 7,5 g Agar-Agar (Merck, Darmstadt) in 385 g deionisiertem Wasser gelöst und mit 2,5 M Natronlauge auf pH 6 eingestellt.

Die Glucose wurde getrennt autoklaviert und als 10 %-ige Lösung zugegeben (10 g Glucose in 90 g deionisiertem Wasser).

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 40 °C bzw. vor dem Gießen wurde 1 ml einer Antibiotika-Stammlösung (0,125 g Penicillin G und 0,125 g Streptomycin-sulfat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in 10 ml deion. Wasser) durch eine mit Sterilfilter (0,22 µm) versehene Spritze hinzugefügt. Penicillin und Streptomycin wurden in Konzentrationen von je 25 ppm (25 µg/ml) zugesetzt, um das Wachstum von Bakterien zu unterbinden. Penicillin wirkt durch Induktion eines unregelmäßigen Längen- und Dickenwachstums bei wachsenden Zellen, hauptsächlich auf Gram-positive Bakterien (Staphylo-, Pneumokokken), aber auch auf viele Gram-negative (Gono-, Meningokokken, Enterobacteriaceen). Viele, von Penicillin nicht abgetötete säurefeste und Gram-negative Bakterien, werden von Streptomycin am Wachstum gehindert (Schlegel 1985).

Beim Beimpfen der Nährböden wurde mit der Kolbenhubpipette jeweils ein Tropfen des Inokulums (s. 4. 4. 4) in die Mitte der Petrischale gegeben und bei Bedarf mit einem Drigalski-Spatel verteilt. Die Petrischalen wurden mit Laborfilm verschlossen.

Für Auswuchsversuche mit den Pilzkapseln (s. 4. 8) wurde Wasser-Agar verwendet, für Kontaminationskontrollen bei der Verkapselung (s. 4. 7) Standard I-Nähragar (Merck, Darmstadt; 18,5 g + 481,5 g deion. Wasser) ohne Zusatz von Antibiotika.

#### 4. 4. 2 Bestimmung der Wachstumsparameter

Zur Optimierung der Anzucht von *H. rhossiliensis* war zuerst die Ermittlung der grundlegenden Wachstumsansprüche wie Temperatur, pH-Wert und wichtiger Medienbestandteile erforderlich, da sie von dem in dieser Arbeit verwendeten Isolat bisher nicht genau bekannt waren (s. 3. 7).

Zur Ermittlung des Temperaturanspruchs wurden aus der Wachstumszone einer gut mit Pilz bewachsenen GN-Agarplatte (s. 4. 4. 1) mit einem Korkbohrer 25 Agarstückchen (Ø 5 mm) ausgestanzt und auf GN-Agar ausgelegt.

Die Agarplatten wurden 35 Tage bei einer Temperatur von 10, 15, 20, 25, 30 oder 35 °C inkubiert (s. 5. 2. 1, Abb. 5. 12 und 5. 13).

Für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurde GN-Agar mit einem pH-Wert von 3, 4, 5, 6, 7 oder 8 verwendet (s. 5. 2. 1, Abb. 5. 12 und 5. 15).

Etwa alle zwei bis drei Tage wurde mit einer Stereolupe (Stereomikroskop SV8, Carl Zeiss, Oberkochen) der Durchmesser des kreisförmig auswachsenden Myzels gemessen. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 35 Tage (s. 4. 8).

### 4. 4. 3 Medienoptimierung

Die Versuche zur Optimierung des Mediums wurden sowohl auf Festmedien als auch in Flüssigkulturen durchgeführt.

Für die Versuche auf Festmedium wurden 25 aus mit Pilz bewachsenem GN-Agar (s. 4. 4. 1) ausgestanzte Agarstückchen ( $\varnothing$  5 mm) auf Medium der gewünschten Zusammensetzung ausgelegt (Tab. 4. 6 und 4. 7), die Platten bei 20 °C und etwa 75 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und das Auswachsverhalten über 35 Tage beobachtet (s. 4. 8).

Tab. 4. 6 Modifizierter GN-Agar (pH 6, s. 5. 2. 2, Abb. 5. 14).

Medien- bestandteil	% (w/w)					
	GN-Agar	1	2	3	4	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10	-	-	0,10	-	-
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,05	-	-	-	0,05	-
KCl	0,05	-	-	-	-	0,05
Hefeextrakt	1,50	1,50	3,00	1,50	1,50	1,50
Agar-Agar	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Glucose	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Saccharose	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
deion. Wasser	94,80	95,00	93,50	94,90	94,95	94,95

Tab. 4. 7 Medium zur Untersuchung des Einflusses von Glutamat und Hefeextrakt (pH 6, s. Abb. 5. 2. 2, Abb. 5. 17).

Medien- bestandteil	% (w/w)						
	1	2	3	4	5	6	7
Hefeextrakt	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1	-
Glutamat	-	0,5	1,0	2,0	3,0	1,0	1,0
Agar-Agar	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glucose	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
deion. Wasser	96,0	95,5	95,0	94,0	93,0	95,4	95,5

Für die Versuche zum Einfluß von PDADMAC auf das Pilzwachstum (s. 5. 2. 2, Abb. 5. 15) wurde Agar mit 2 % (w/w) Glucose, 0,5 % (w/w) Hefeextrakt und 1, 2 oder 3 % (w/w) PDADMAC Nr. 1 verwendet.

Die Optimierungsversuche in Schüttelkulturen wurden in verschiedenen Flüssigmedien (Tab. 4. 8 und 4. 9) entsprechend 4. 4. 4 durchgeführt. Zur Bewertung des Pilzwachstums in diesen Medien diente die nach 4. 5. 4. 3 ermittelte Biotrockenmasse.

Tab. 4. 8 Zusammensetzung verschiedener Flüssigmedien (pH 6, s. Abb. 5. 2. 2, Abb. 5. 17)

Medien- bestandteil	% (w/w)				
	1	2	3	4	5
Multivitaminmischung	-	-	-	-	1
Hefeextrakt	0,5	0,5	0,5	0,2	-
Glutaminsäure	-	-	-	1	1
Mes-NaOH-Puffer	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Saccharose	2	-	-	-	-
Glucose	-	2	3	2	2
Deion. Wasser	96,7	96,7	95,7	96	95,2

Tab. 4. 9 Untersuchung verschiedener technischer Medien (pH 6, s. Abb. 5. 2. 2, Abb. 5. 17)

Medien- bestandteil	% (w/w)					
	1	2	3	4	5	6
Glucose	2	2	-	-	-	-
Yeast Extract	0,5	-	-	-	-	-
Maisquellwasser (50 %)	-	12,5	12,5	-	-	-
Bäckerhefe	-	-	-	0,25	0,5	0,5
Kartoffelmehl	-	-	-	1,71	3,42	1,71
MES-NaOH-Puffer	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
deion. Wasser	97	85	87	97,54	95,58	97,39

Die Durchführung der Versuche zur Optimierung des Kapselmediums ist unter 4. 7 angegeben.

#### 4. 4. 4 Anzucht in Schüttelkultur

Die Anzucht und Bereitstellung ausreichender Mengen Biomasse von *H. rhossiliensis* für die Verkapselungsversuche und zur Inokulation der Fermenter erfolgte in dem nach 4. 4. 3 optimierten Flüssigmedium (Tab. 4. 10).

Für eine 500 ml Flüssigkultur (1 l-Kulturkolben ohne bzw. mit drei Schikanen und Wattestopfen) wurden 2,5 g Hefeextrakt und 2 g MES-NaOH-Puffer in 395,5 g deionisiertes Wasser gegeben und mit 2,5 M Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt. Getrennt davon wurden 10 g Glucose in 90 g deionisiertem Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden separat autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Lösungen zusammengegeben. Anschließend wurde 1 ml der Antibiotika-

Stammlösung (s. 4. 4. 1) durch eine mit Sterilfilter (0,22 µm) versehene Spritze zugegeben und die Kultur angeimpft.

Tab. 4. 10 Flüssigmedium zur Schüttelkolbenanzucht (pH 6,0).

Medienbestandteil	% (w/w)
Glucose	2,0
Hefeextrakt	0,5
MES-NaOH-Puffer	0,4
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,1
Penicillin	0,0025
Streptomycin	0,0025
deion. Wasser	96,595

Zum Animpfen wurde entweder bei 5 °C oder – 20 °C gelagerte Biomasse oder auf GN-Agar angezogenes Pilzmyzel (s. 4. 4. 1) verwendet. Bei Verwendung von eingefrorenem Pilz wurde die Biomasse über Nacht bei 5 °C aufgetaut.

Beim Einsatz feuchter Biomasse war es für die Anzucht von feinem Myzel von großem Vorteil, wenn schon das Inokulum möglichst fein ist. Bei einem gröberen Inokulum ist die Gefahr größer, daß der Pilz in Form von unerwünschten Pellets wächst. Zum Animpfen von 10 Schüttelkulturen wurden etwa 10 g Biofeuchtmasse in 250 ml des Flüssigmediums (Tab. 4. 10) suspendiert und auf einem Magnetrührer 30 min bei 600 UpM gerührt. Dabei sollten Pilzpellets zerschlagen und das Pilzmyzel möglichst fein im Medium verteilt werden. Zur Abtrennung verbliebener größerer Myzelbruchstücke wurde die Suspension anschließend mit einem Chemikalienlöffel durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 500 µm passiert. Die Suspension wurde direkt als Inokulum verwendet, wobei zum Beimpfen einer 500 ml-Flüssigkultur 10 ml dienten, die mit einer Kolbenhubpipette zugegeben wurden. Die Pipettenspitzen waren an ihrer Spitze verkürzt, um eine größere Öffnung freizugeben.

Wurde auf GN-Agar angezogenes Pilzmyzel (s. 4. 4. 1) zum Animpfen verwendet, wurde mit einem sterilen Spatel Pilz von zwei gut bewachsenen Agarplatten abgekratzt und wie bei der ersten Variante in 250 ml Medium gerührt und durch ein Sieb passiert. Auch hier wurden 10 ml je 500 ml-Schüttelkultur zugegeben.

Die Inkubation erfolgte bei 20 °C in einem temperierten Schüttelinkubator (Multitron, Fa. Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Um das anwachsende Pilzmyzel in den Schüttelkolben nicht durch zu hohe Scherkräfte zu schädigen, wurden die Kulturen bis zum vierten Tag bei 80 UpM geschüttelt und danach bei 120 UpM. Aus den Kulturen wurden täglich 5 ml Probe steril entnommen, unter dem Mikroskop (Phasenkontrastmikroskop Zeiss Axioplan mit Kamera MC 100, Carl Zeiss, Oberkochen) bei 1.000facher Vergrößerung auf Kontaminationen untersucht und mittels HPLC

(s. 4. 5. 4. 1) oder Blutzuckerschnelltest (s. 4. 5. 4. 2) der Glucosegehalt des Mediums bestimmt.

Nach 8 Tagen Inkubation wurde der Pilz geerntet. Dazu wurde die Biomasse unter sterilen Bedingungen unter Membranpumpenvakuum (zwischen 15 und 25 mbar) über einem Schwarzbandfilter (Schleicher und Schüll, Düren) abgesaugt. Die Biomasse wurde mit etwa 250 ml sterilem Leitungswasser gewaschen und in kleinen Portionen in 100 ml-Flaschen bei 5 °C gelagert. Sollte die Biomasse länger als eine Woche gelagert werden, wurde sie bei –20 °C eingefroren.

## 4. 5 Fermentation von *Hirsutella rhossiliensis*

### 4. 5. 1 Aufbau und Vorbereitung

Die Fermentationen wurde im Fermentersystem Labfors® (Infors AG Bottmingen, Schweiz; Abb. 4. 5) durchgeführt. Ein angeschlossener PC mit der installierten Fermentationssoftware IRIS® NT 4.0 (Infors AG Bottmingen, Schweiz) diente zur Aufnahme der Meßwerte für die späteren Auswertungen (s. 4. 5. 3).



Abb. 4. 5 5 l - Fermentersystem Labfors® (Infors AG Bottmingen, Schweiz).

Das Fermentationsgefäß besitzt ein Totalvolumen von 7,5 l und ein Arbeitsvolumen von 5 l. Es handelt sich um einen Rührkesselfermenter mit einer zentralen Rührwelle und zwei Scheibenrührern. Das Bedienpanell übernimmt alle Meß- und Regelungsaufgaben. Es besitzt ein per Menüführung gesteuertes Display, auf dem ständig Ist- und Sollwert wichtiger Parameter (Rührerdrehzahl in UpM, Begasungsrate in l/min oder in V/VM, Temperatur in °C, Sauerstoffpartialdruck in % und der pH-Wert) angezeigt werden. Die unter dem Bedienpanell liegende Konsole besteht aus vier einzelnen Segmenten, in denen (von unten nach oben) ein Temperierungsmodul mit Heizung und Wasserpumpe, ein Modul mit Versorgungsanschlüssen für Luft und Wasser, ein Signalverstärkermodul und ein Pumpenmodul mit vier Schlauchpumpen für

Säure-, Lauge-, Antischaummittel- und Substratzugabe untergebracht sind. Das Kulturgefäß ist von länglicher Geometrie (Abb. 4. 6).

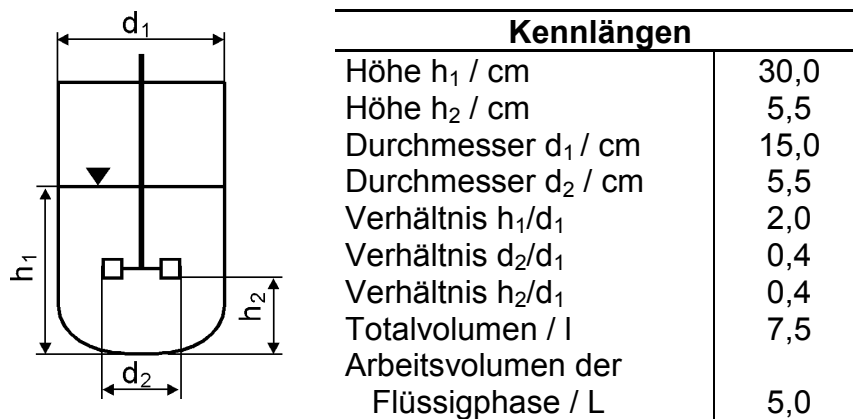


Abb. 4. 6 Geometrie der Fermentationsgefäße.

Im Deckel sind um die zentrale Rührwelle mit dem durchstoßfreien Magnetrührwerk eine pH-, eine  $pO_2$  und eine pT100-Elektrode angeordnet, die zur Temperaturmessung dient. Alle Anschlüsse z. B. für die Probenahmeverrichtung, die Korrekturmittelzugabe oder den Abluftkühler sind ebenfalls im Gefäßdeckel untergebracht. Nicht benötigte Durchführungen sind mit einem Stopfen verschlossen. Zur Vereinfachung der Probenahme wurde eine im Eigenbau hergestellte Vorrichtung verwendet (Abb. 4. 7).

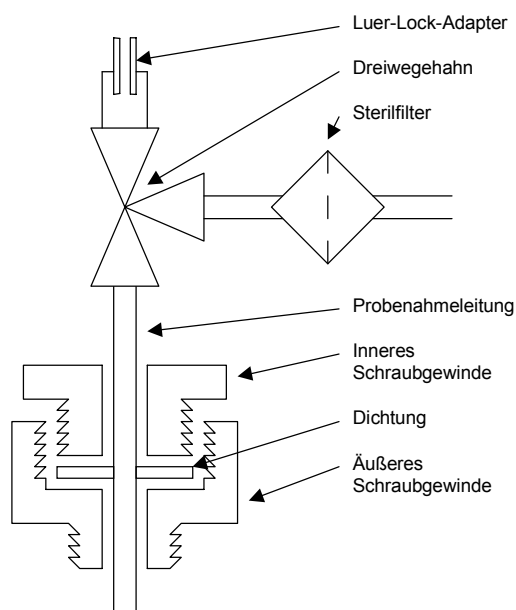


Abb. 4. 7 Probenahmeverrichtung.

Alle Durchstöße, Gewinde, Dichtungen und auch der Dichtungsring zwischen Fermentationsgefäß und Fermenterdeckel wurden vor dem Einsetzen abgetrocknet und



mit Silikonfett behandelt. Für die Zuluft wurde ein Sterilfilter (0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen) verwendet, die alle drei Fermentationen ausgetauscht wurde. Da sich der am Anfang verwendete Abluftfilter sehr schnell zusetzte, wurde die Abluft durch eine Waschflasche mit 5 M Natronlauge geleitet, um Kontaminationen durch den Abluftschlauch zu vermeiden.

Mit der **pH-Elektrode** wurde vor jeder Fermentation eine Zweipunktkalibrierung mit Puffern von pH 4 und pH 7 durchgeführt. Die Elektrode wurde nach jeder Fermentation zuerst 1 h mit Elektrodenreiniger (Pepsin/HCl, Mettler-Toledo GmbH, Gießen), danach 1 h mit Diaphragmenreiniger (Thioharnstoff/HCl, Mettler-Toledo GmbH, Gießen) behandelt und anschließend in 3 M Kaliumchlorid-Lösung zur Regeneration und Lagerung aufbewahrt.

Auch mit der **pO<sub>2</sub>-Elektrode** wurde eine Zweipunktkalibrierung durchgeführt. Dafür wurde die Elektrode in ein im Lieferumfang enthaltenes Nullstromgel getaucht und der ausgegebene Meßwert gleich 0 % gesetzt. Nach dem Autoklavieren des Mediums und dem Anschluß aller Versorgungsleitungen der Konsole an das Fermentationsgefäß wurde die pO<sub>2</sub>-Elektrode für mindestens fünf Stunden an der Stromversorgung im verwendeten Fermentationsmedium vorpolarisiert. In dieser Zeit wurde das Medium auch auf die gewünschte Fermentationstemperatur von 20 °C temperiert. Anschließend wurden der Fermenter angeimpft und die gewünschte Begasungsrate und Rührerdrehzahl eingestellt. Nach Erreichen eines stabilen Meßsignals wurde der nun ausgegebene Meßwert gleich 100 % gesetzt. Die Kalibrierung wurde vor jeder Fermentation wiederholt.

Das **Fermentationsmedium** sollte sich in seiner Zusammensetzung nur geringfügig vom Medium der Vorkultur unterscheiden, um die Adaption- oder lag-Phase für den Pilz möglichst kurz zu halten. Die gleiche Energie- und Kohlenstoffquelle, ähnliche Nährstoff- und Salzkonzentrationen gewährleisten, daß die Zellen keine neuen Enzyme synthetisieren müssen und daß nur wenige essentielle Zellinhaltsstoffe aus den Zellen herausdiffundieren (Einsele *et al.* 1985).

Die Medien für die Fermentation und für die Vorkulturen weisen bis auf zwei Ausnahmen die gleiche Zusammensetzung auf (vgl. Tab. 4. 10 und 4. 11). Im Fermenter kann auf die Zugabe des Puffers und der Antibiotika verzichtet werden. Außerdem wurden statt 2 % (w/w) Glucose nur 1 % (w/w) eingesetzt, da es aufgrund der hohen Viskosität der Kulturbrühe zum Ende der Fermentation hin nicht möglich war, die Glucose auch nur annähernd aufzubrauchen.

Hefeextrakt und di-Kaliumhydrogenphosphat wurden eingewogen, in deion. Wasser gelöst und 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck direkt im Fermentationsgefäß mit allen Einbauten in einem großen Autoklaven sterilisiert. Die Glucose wurde mit

10 % (w/w) konzentriert angesetzt und getrennt autoklaviert. Sie wurde anschließend aseptisch in eine Animpfflasche überführt und mit steriler Druckluft durch die Ernteleitung in das Fermentationsgefäß gedrückt.

Tab. 4. 11 Zusammensetzung des Fermentationsmediums (pH 6,0).

Medienbestandteil	% (w/w)
Glucose	1,0
Hefeextrakt	0,5
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,1
deion. Wasser	98,4

Um die Bildung von Schaum (besonders bei hohen Leistungseinträgen in das Fermentationsgefäß) zu verhindern, wurden dem Medium vor jeder Fermentation einige Tropfen des Antischaummittels Struktol J673 (Schill und Seilacher, Hamburg) zugesetzt.

Vor den Fermentationen wurden am Bedienpanell die Sollwerte aller relevanten Parameter eingegeben bzw. kontrolliert.

## 4. 5. 2 Fermentation

Angeimpft wurde der gemäß 4. 5. 1 vorbereitete Fermenter mit Flüssigkulturen aus dem Schüttelkolben (s. 4. 4. 4). Die Schüttelkulturen wurden sechs bis acht Tage inkubiert, aseptisch in eine Animpfflasche überführt und mit steriler Druckluft durch die Ernteleitung ( $\varnothing$  10 mm) in das Fermentationsgefäß gedrückt. Die Biotrockenmassekonzentration der Vorkulturen lag zwischen 4 und  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Das Volumen des Inokulums wurde bei beiden Fermentereinheiten auf 10 % des Arbeitsvolumens (5,0 l) eingestellt.

Nach dem Starten der Fermentation am Bedienpanell begann auch der angeschlossene PC mit der Aufzeichnung der Meßwerte.

Um der Kultur eine kleine Probe mit Pilzmyzel zu entnehmen bzw. um die insgesamt gebildete Biomasse zu ernten, wurde über das Bedienpanell kurzzeitig eine hohe Begasungsrate von 1,6 V/VM eingestellt und die Abluftleitung abgeklemmt. Durch den entstehenden Überdruck im Fermentationsgefäß konnte die Biomasse über die Ernteleitung ( $\varnothing$  10 mm) in geeignete Flaschen überführt werden. Kleine Probenmengen (z. B. für die Glucosebestimmung) konnten über das Probenahmeventil (Abb. 4. 7) entnommen werden.

Die Fermentationsdauer lag zwischen 50 und 70 Stunden, sie wurde von der erreichten Biotrockenmassekonzentration und der Viskosität des Mediums bestimmt.

Zur Pilzernte wurde bei hoher Begasungsrate und abgeklemmter Abluftleitung (s. o.) die gesamte Kulturbrühe in sterile Flaschen überführt und unter der Cleanbench die Biomasse unter Membranpumpenvakuum (zwischen 15 und 25 mbar) über einen Schwarzbandfilter (Schleicher und Schüll, Düren) abgesaugt. Die Biomasse wurde mit sterilem Leitungswasser gewaschen und in kleinen Portionen in 100 ml-Flaschen bei 5 °C gelagert (vgl. 4. 4. 4).

### 4. 5. 3 Berechnungen

Zur mathematischen Beschreibung der Fermentation von *H. rhossiliensis* soll in dieser Arbeit die Anwendbarkeit des Wachstumsmodells nach Monod geprüft werden. Im Folgenden werden die dazu notwendigen Berechnungen abgeleitet und ihre Hintergründe kurz erläutert.

Trägt man die während der Fermentation gebildete Zellmasse in halblogarithmischem Maßstab gegen die Zeit auf, so erhält man die in Abb. 4. 8 dargestellte sigmoidal verlaufende Wachstumskurve (Einsele *et al.* 1985; Dellweg 1987).

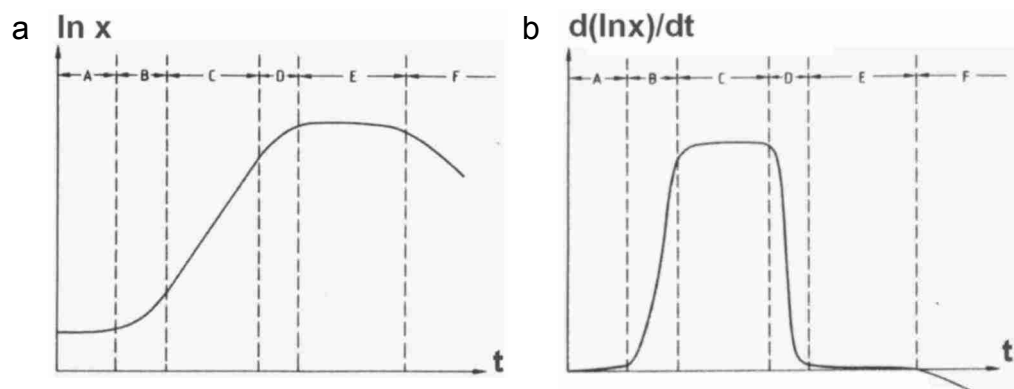


Abb. 4. 8 Wachstumskurve (a) und spezifische Wachstumsrate (b) (Einsele *et al.* 1985; Dellweg 1987).

Die Wachstumskurve ist in mehrere charakteristische Phasen unterteilt, die Adaptions- oder lag-Phase (Abb. 4. 8 A), die Beschleunigungsphase (Abb. 4. 8 B), die exponentielle Wachstumsphase (Abb. 4. 8 C), die Verzögerungsphase (Abb. 4. 8 D), die stationäre Phase (Abb. 4. 8 E) und die Absterbephase (Abb. 4. 8 F).

In der Adaptions- oder lag-Phase (Abb. 4. 8 A) stellt die Zelle ihren Metabolismus auf die neue Nährstoffsituation um. Ihre Länge hängt z. B. davon ab, inwieweit sich die angebotenen Nährstoffe von den vorherigen unterscheiden (s. 4. 5. 2), wird aber auch vom Alter des Inokulums maßgeblich beeinflusst. Nach der Umstellung auf die neue Nährstoffsituation beginnen die Zellen zu wachsen. Diese Beschleunigungsphase (Abb. 4. 8 B) geht nach kurzer Zeit in die exponentielle Wachstumsphase

über (Abb. 4. 8 C), in der das Wachstum mit maximaler Wachstumsrate verläuft. Am Ende dieser Phase verlangsamt sich das Zellwachstum. Verantwortlich dafür ist vor allem der allmählich eintretende Nährstoffmangel und die infolge der hohen Viskosität limitierte Sauerstoffversorgung. Diese Verzögerungsphase (Abb. 4. 8 D) wird schließlich abgelöst von der stationären Phase (Abb. 4. 8 F), in der zellinterne Reservestoffe verbraucht werden. Wachstum und Autolyse der Zellen halten sich zu diesem Zeitpunkt noch die Waage. Überwiegt schließlich die Autolyse der Zellen, so folgt der Verzögerungs- die Absterbephase, die durch eine Abnahme der Zellmasse gekennzeichnet ist (Abb. 4. 8 F).

Eine quantitative mathematische Beschreibung des Pilzwachstums ist in der Regel nur in der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 4. 8 C) möglich. Da für das Wachstum von filamentösen Pilzen keine praktikablen Modelle vorliegen, wird hier das Längenwachstum des Pilzmyzels in der gleichen Weise wie die Zellteilung (z. B. bei Bakterien) oder die Sprossung (z. B. bei Bäckerhefe) behandelt (Berechnungsmodell des ausgeglichenen Wachstums nach Monod). Dellweg (1987) weist jedoch darauf hin, daß diese Ansätze strenggenommen nicht als gleichwertig anzusehen sind.

Die allgemeine Differentialgleichung zur Beschreibung des Zellwachstums (z. B. bei Bakterien) lautet:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (4. 2)$$

In dieser Gleichung steht X für die Zellmasse (mit der Einheit  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), t für die Zeit (mit der Einheit s) und  $\mu$  für die spezifische Wachstumsrate.  $dx/dt$  ist das Differential der Zellmasse X. Es gibt die momentane Änderung der Zellmasse X mit der Zeit t an. Diese Wachstumsrate besitzt die Einheit  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Damit ergibt sich für die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  die Einheit  $\text{h}^{-1}$ . Sie steigt nach Abschluß der Adaptionsphase, in der sie den Wert  $0 \text{ h}^{-1}$  besitzt, in der Beschleunigungsphase rasch an und stagniert in der stationären Phase auf einem konstanten Maximalwert ( $\mu_{\max}$ ). Der Wert von  $\mu_{\max}$  wird in erster Linie durch die physikalischen und chemischen Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Nährstoffart und Sauerstoff- und Stickstoffversorgung festgelegt. Zur Bestimmung von  $\mu_{\max}$  wird die Differentialgleichung durch Trennung der Variablen integriert:

$$\int \frac{dX}{X} = \int \mu_{\max} \cdot dt \quad (4. 3)$$

$$\mu_{\max} = \frac{\Delta \ln X}{\Delta t} \quad (4. 4)$$

Aus Gleichung 4. 4 folgt, daß die spezifische Wachstumsrate der ersten Ableitung der in halblogarithmischem Maßstab dargestellten Wachstumskurve entspricht (Dellweg 1987). Die Verdopplungszeit, d. h. die Zeit, in der sich die Zellmasse verdoppelt, ergibt sich zu:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (4. 5)$$

Nach Ablauf der exponentiellen Wachstumsphase fällt die spezifische Wachstumsrate in der Verzögerungsphase wieder rasch ab und nimmt in der stationären Phase wie in der Adaptionsphase den Wert 0 h<sup>-1</sup> an.

Um die spezifische Wachstumsrate für das Wachstum von *H. rhossiliensis* zu ermitteln, wurde zuerst eine geeignete Regressionskurve durch die Meßwerte der Biotrokenmasse gelegt. Als Grundlage dieser Ausgleichskurve diente eine auf der Boltzmann-Funktion basierende sigmoidal verlaufende Wachstumskurve, die hier mit Hilfe spezieller Software (Microcal Origin, Version 4.10, 32 Bit, Microcal Software) generiert wurde:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (4. 6)$$

$A_1$  = Ausgangswert

$A_2$  = Endwert

$x_0$  = x-Koordinate des Wendepunkts

$dx$  = Zeitkonstante

Die Erstellung der Ausgleichskurve diente dazu, Fehler zu relativieren, die aus der geringen Anzahl der Meßwerte und den eventuell auftretenden „Ausreißern“ resultierten. Nach softwaregestützter Logarithmierung und anschließender Differenzierung dieser Kurven ergab sich die spezifische Wachstumsrate.

Von Interesse für eine mathematische Beschreibung des Pilzwachstums ist ebenfalls die Glucose- bzw. der Substrataufnahmerate sowie die spezifische Substrataufnahmerate (Sukatsch und Dziengel 1984):

$$Q_s = - \frac{dS}{dt} \quad (4. 7)$$

$Q_s$  = Substrataufnahmerate (g·l<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)

$dS/dt$  = momentane Änderung der Substratkonzentration mit der Zeit

$$q_s = \frac{Q_s}{X} \quad (4.8)$$

$q_s$  = spezifische Substrataufnahmerate ( $h^{-1}$ )

Die Substrataufnahmerate wurde in der vorliegenden Arbeit nur auf die Aufnahme der zugegebenen Glucose bezogen. Nach Auftragung der mit Hilfe der HPLC-Anlage bestimmten Glucosekonzentrationen gegen die Zeit wurde eine Regressionskurve auf der Grundlage der in Gleichung 4. 6 beschriebenen Boltzmann-Funktion erstellt. Differenziert ergab sie die Glucoseverbrauchsrate, angegeben in  $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$ . Durch Wechsel des Vorzeichens und Bezug auf die aktuelle Zellkonzentration wurde schließlich die spezifische Glucoseverbrauchsrate in  $h^{-1}$  ermittelt.

Ferner wurden für die Fermentation Ertrag und Ertragskoeffizient berechnet. Der Ertrag  $X$  ist definiert als die Differenz zwischen der anfänglichen ( $X_0$ ) und der maximalen ( $X_{max}$ ) Zellmasse, bzw. als die Differenz der entsprechenden Zellkonzentrationen (Sukatsch und Dziengel 1984; Schlegel, 1985):

$$X = X_{max} - X_0 \quad (4.9)$$

Von besonderer Bedeutung ist das Verhältnis des Ertrags  $X$  zur Substrataufnahme  $S$ . Werden beide Größen in Gewichts- oder Konzentrationseinheiten angegeben, so bezeichnet man den Quotienten als Ertragskoeffizient  $Y$  (yield):

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (4.10)$$

Abschließend wurde eine Kontrollrechnung durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Wachstumsmodell nach Monod hier auf das Wachstum des filamentösen Pilzes *H. rhossiliensis* übertragen werden darf. Dazu wurden mit den berechneten Wachstumsraten und Verdopplungszeiten die am Ende der Fermentation zu erwartenden Biotrockenmassen berechnet und mit den tatsächlichen Werten verglichen (Dellweg 1987).

$$X_{Ende} = X_0 \cdot 2^{\frac{t_{gesamt}}{t_d}} \quad (4.11)$$

$X_{Ende}$  = Biotrockenmasse am Ende der Fermentation  
 $X_0$  = Biotrockenmasse zu Beginn der Fermentation  
 $t_{gesamt}$  = Fermentationsdauer  
 $t_d$  = Verdopplungszeit

**4. 5. 4 Analytik****4. 5. 4. 1 Glucosebestimmung mittels HPLC**

Der Glucosegehalt der Kulturmedien wurde durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC, Tab. 4. 12) oder einen Blutzuckerschnelltest (s. 4. 5. 4. 2) bestimmt. Dabei wurde die HPLC für eine genaue Bestimmung der Werte verwendet, besonders zur Bestimmung der grundlegenden Glucosekonzentrationen für die unter 4. 5. 3 angegebenen Berechnungen, der Blutzuckerschnelltest für eine schnelle und handliche Sofortbestimmung.

Tab. 4. 12 HPLC-Analyseanlage zur Glucosebestimmung.

Stationäre Phase:	CHO-611-Säule (300 mm x 6,5 mm ID, Natriumpolystyrolvinylbenzol, Interaction)	
Laufmittel:	1mM NaOH, 1mM EDTA	
Flußrate:	0,5 ml · min <sup>-1</sup>	
Probenvolumen:	20 µl	
Aufbau:	Probenaufgabe:	Basic Marathon, Fa. Spark
	Pumpe:	LC-10AT Liquid Chromatograph, Fa. Shimadzu
	Druck:	ca. 70 bar
	Entgaser:	DEGU 3 A – Degaser, Fa. Shimadzu
	Ofen:	CTO-10A Column Oven, Fa. Shimadzu
	Temperatur:	80 °C
	Detektion:	RID-10A Refractive Index Detector, Fa. Shimadzu
	Steuerung:	SCL-10A VP System Controller, Fa. Shimadzu
	Steuersoftware:	Class VP 5.0, Fa. Shimadzu
Retentionszeit:	Glucose	9,6 min

Für die Bestimmung wurden 1,5 ml Probe steril entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zentrifugation wurden Pilz und Medium getrennt (3 min, 20.800 x g). Wenn sich besonders feines Pilzmyzel nicht durch Zentrifugation vom Medium trennen ließ, wurde die Probe mittels einer Spritze mit aufgesetztem Filter (0,2 µm) vom Pilz befreit.

Es ist eine 1:10 Verdünnung der Proben erforderlich, um die Säule der HPLC nicht zu überladen. Dazu wurden 100 µl des klaren Überstandes mit 900 µl Laufmittel (1mmol/l Na<sub>2</sub>-EDTA und 1mmol/l NaOH) in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, gemischt und nochmals 3 min bei 20.800 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 900 µl in ein Vial überführt, das direkt von einem Autosampler aufgenommen werden konnte. Bei Bedarf wurden die Proben bis zur Analyse bei – 20 °C eingefroren, da selbst kleinste Pilzreste in den Vials noch auswachsen.

Die Glucosebestimmung erfolgte durch Elution auf einem basischen Anionentauscher mit verdünnten Basen (1 mM NaOH und 1 mM EDTA). Die stationäre Phase

der Trennsäule bestand aus dem unpolaren und porösen Natriumpolystyrolvinylbenzol. Geladene Teilchen werden durch die Trennsäule nicht verzögert. Ungeladene Teilchen werden in der Trennsäule mehr oder weniger stark verzögert. Kleine Teilchen brauchen am längsten um die Trennsäule zu passieren, große Teilchen am kürzesten (Verirrungsprinzip). Zur Detektion wurde ein Brechungsindex-Detektor verwendet.

Zur Kalibrierung wurde ein 1 %-iger Glucose-Standard verwendet (Einpunktkalibrierung), der, wie alle Proben auch, 1:10 mit Laufmittel verdünnt wurde. Die sich bei der Analyse des Standards ergebene Fläche unterhalb des Peaks wurde von der eingesetzten Software mit der zugehörigen Glucosekonzentration von  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  korreliert. Durch Integration und Vergleich mit den Flächen unterhalb der Probenpeaks konnte das System anschließend die Glucosekonzentrationen der Proben ermitteln.

#### 4. 5. 4. 2 Glucosebestimmung mittels Blutzuckerschnelltest

Zum Einsatz kam ein handelsübliches Blutzuckerschnelltestgerät (Accutrend *alpha*, Boehringer, Mannheim). Das Meßprinzip beruht auf einer reflexionsphotometrischen Bestimmung von Glucose.

Da das Testgerät für die Analyse von frischem Kapillarblut ausgelegt ist, muß auch der pH-Wert der Probe auf pH 6,8 eingestellt werden. Um innerhalb des Meßbereichs ( $200 - 5000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) zu bleiben, müssen die Proben verdünnt werden. Eine 1:5 Verdünnung der Probe mit Puffer (Tab. 4. 13) konnte beiden Anforderungen gerecht werden. Dazu wurden 100 µl des von Pilz befreiten Kulturüberstandes mit 400 µl der Pufferlösung (Tab. 4. 13) in einem Reaktionsgefäß vereinigt, gemischt und zentrifugiert (3 min,  $20.800 \times g$ ). Vom Überstand wurden ohne Berührung 25 µl auf den in das Gerät eingeführten Teststreifen pipettiert. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Tab. 4. 13 Zusammensetzung des Puffers für den Blutzuckergerätschnelltest

Substanz	ml
Citronensäure 0,1 mol/l	23,5
di-Natriumhydrogenphosphat 0,2 mol/l	76,5

#### 4. 5. 4. 3 Biofeucht- und Biotrockenmassebestimmung

Biofeucht- und Biotrockenmasse wurden gravimetrisch bestimmt. Um die Biofeuchtmasse zu ermitteln, wurden Schwarzbandfilter (Schleicher und Schüll, Düren) über Nacht im Trockenschrank bei  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$  getrocknet, im Exsikkator über Silikagel abge-



kühlt und auf einer Analysenwaage auf 1/10.000 g genau gewogen. Unter Membranpumpenvakuum (zwischen 15 und 25 mbar) wurde ein definiertes Probevolumen eine Minute in einem Büchnertrichter über den Filter abgesaugt. Der Filter mit der Biomasse wurde nochmals auf 1/10.000 g genau gewogen. Der Quotient aus der Differenz der ermittelten Massen und dem Volumen des abgesaugten Probenteils ergab schließlich die Biofeuchtmasse, angegeben in  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Durch Trocknung bei 105 °C über Nacht, anschließendes Abkühlen im Exsikkator und Wägung wurde aus der Biofeucht- die Biotrockenmasse ermittelt. Da ihre Bestimmung eine größere Genauigkeit besitzt, wurde sie für die Berechnungen verwendet (s. 4. 5. 3).

#### 4. 5. 4. 4 Siebanalyse der Biomasse

Zur Bestimmung der Größenverteilung des bei der Anzucht in Flüssigmedium gebildeten Myzels wurden Siebanalysen durchgeführt. Dazu standen Analysensiebe mit Maschenweiten von 1.000, 500, 400, 300, 200 und 100  $\mu\text{m}$  zur Verfügung. Die Siebe wurden vor der Benutzung getrocknet und gewogen. Das Probenvolumen wurde 1:5 mit deion. Wasser verdünnt und auf die Siebe gegeben. Um eine vollständige Verteilung des Myzels auf den einzelnen Sieben zu erreichen, wurde mit etwa 10 l deion. Wasser nachgespült. Anschließend wurden die Siebe bei 105 °C getrocknet und erneut gewogen.

Durch Auftragung dieser Massenanteile gegen die Maschenweite der Siebe erhält man die Verteilungsdichtekurve. Sie gibt an, welcher Massenanteil in einem bestimmten Partikelgrößenintervall enthalten ist. Das Integral der Verteilungsdichtekurve ist die Verteilungssummenkurve. Ihr ist zu entnehmen, welcher Massenanteil unterhalb einer bestimmten Partikelgröße liegt. Diese Angabe ist hier besonders von Bedeutung, da die Myzelpartikel nicht unbedingt eine definierte Größe besitzen, sondern eine kritische Größe nicht überschreiten sollen.

#### 4. 5. 4. 5 pH- und Temperaturmessung

Die Messung des pH-Wertes erfolgte potentiometrisch mit Hilfe von Einstab- Glaselektroden. Parallel wurde die Temperatur elektronisch mit Pt-100-Meßfühlern bestimmt und automatisch zur Korrektur berücksichtigt. Die Kalibrierung der pH-Elektroden wurde mit handelsüblichen Puffern (pH 7,0 und pH 4,0, Riedel-de Haen, Seelze/Hannover) durchgeführt. Im Abstand von 4 Wochen bzw. nach jeder Fermentation wurden die Elektroden mit einer aus Pepsin und Salzsäure bestehenden Reinigungslösung (Ingold, Urdorf, Schweiz) von eiweißhaltigen Ablagerungen befreit.

Der verwendete Fermenter (s. 4. 5. 1) verfügt über eine eigene pH-Meß- und Regeleinheit.

Für pH-Messungen von Medien, Proben, etc. fand ein Mikroprozessor-pH/ION Meter pMX 2000 (Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten (WTW), Weilheim) mit Extender E 2000 Verwendung, das mit einer pH-Elektrode von Fa. Ingold und einem Pt-100-Temperaturfühler (TFK 530, WTW) ausgestattet ist.

## 4. 6 Verkapselung

In Optimierungsversuchen im kleineren Maßstab wurden verschiedene Kapselsysteme und der Einfluß unterschiedlicher Kapselzusammensetzungen auf das Auswachsen von *Hirsutella rhossiliensis* untersucht (s. 4. 6 1 bzw. 5. 4). Für Pathogenitätstests (s. 4. 10 bzw. 5. 5) am Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde Münster der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) wurden größere Mengen Kapseln benötigt, die gemäß 4. 6. 2 bereitgestellt wurden.

### 4. 6. 1 Kapselherstellung für Auswachsversuche

#### 4. 6. 1. 1 Kapseln aus SEC und PDADMAC

In allen Versuchen kamen SEC und PDADMAC Nr. 1 mit einer Endkonzentration von 2 % (w/w) zum Einsatz. Der pH-Wert aller Lösungen wurde vor dem Autoklavieren mit 2,5 M Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt. Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Allen Lösungen wurden nach dem Autoklavieren 25 ppm Penicillin und 25 ppm Streptomycin durch einen Sterilfilter zugegeben, um Kontaminationen durch Bakterien zu unterbinden (s. 4. 4. 1).

Angesetzt wurden für jede der untersuchten Kapselzusammensetzungen jeweils 100 g Kapselmasse. Die SEC und alle übrigen Komponenten wurden getrennt in deion. Wasser gelöst bzw. suspendiert und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Einzelkomponenten unter der Cleanbench mit der entsprechenden Menge Pilz vermischt. Die Einzelkomponenten wurden so eingewogen, daß sich nach der Vereinigung die gewünschte Kapselzusammensetzung ergab. Die Kapselmasse wurde anschließend mit einem Wischer durch ein Metallsieb ( $\varnothing$  8 cm, Maschenweite 500  $\mu$ m) passiert und in einem Becherglas aufgefangen.

Zum Eintropfen wurden 10 ml mit einer sterilen Einwegspritze aufgezogen und eine Kanüle ( $\varnothing$  1,2 mm) aufgesetzt. Die Spritze mit Kanüle wurde so in ein Stativ eingespannt, daß der Abstand zwischen Kanülenspitze und Oberfläche der PDADMAC-Lösung 10 cm betrug. Für die Vernetzerlösung wurde ein 250 ml Becherglas (hohe Form) verwendet. Die Rührgeschwindigkeit (Länge des Rührkerns 2,5 cm) betrug 300 UpM. Das Eintropfen erfolgte per Hand. Es entstanden Kapseln mit einem Durchmesser von etwa 3 mm. Die Kapseln verblieben nach dem Eintropfen bis zum Schrumpfungsbeginn in der Vernetzerlösung (meist 20 min), wurden dann mit einem Natriumlöffel entnommen und in 200 ml Waschlösung gegeben. Wenn die Kapseln niedermolekulare Substanzen wie z. B. Hefeextrakt oder Glucose enthielten, die beim Waschen aus den Kapseln diffundieren können, wurden diese Komponenten auch der Waschlösung in gleicher Konzentration zugesetzt. War dies nicht der Fall,

wurde steriles Leitungswasser zum Waschen verwendet. Zur Untersuchung des Auswachsverhaltens wurden die Kapseln entnommen und auf Wasser-Agar ausgelegt (s. 4. 8).

Variiert wurden der Biofeuchtmassegehalt (0,1 bis 15 % (w/w)) der Kapseln bei 15 % (w/w) Maiskleber und 0,5 % (w/w) Hefeextrakt (Abb. 5. 28 und 5. 29) und der Maiskleber- (0 bis 15 % (w/w)) und Hefeextraktgehalt (0 bis 0,5 % (w/w)) bei 15 % (w/w) Biofeuchtmasse (Abb. 5. 31 und 5. 32).

In einem anderen Versuch wurden bei 1 % (w/w) Biofeuchtmasse autoklavierte Bäckerhefezellen oder das Hefepulver Auxoferm® (Ohly, Deutsche Hefe Werke, Hamburg) als Kapselmedium untersucht (Abb. 5. 33). Die Bäckerhefe wurde entweder frisch (Deutsche Hefe Werke, Hamburg) oder als Trockenpulver eingesetzt (Dr. August Oetker Nahrungsmittel, Bielefeld), wobei 1 g frischer Bäckerhefe 0,28 g Trockenpulver entsprechen. Alle Massenangaben in dieser Arbeit beziehen sich auf frische Bäckerhefe.

Im Zusammenhang mit der Optimierung der Sporulation (s. 5. 4. 1. 3, Abb. 5. 34 bis 5. 37) wurden Glucose (2 % (w/w)), Hefeextrakt (0,1 bis 0,5 % (w/w)), Bäckerhefe (0,25 – 3 % (w/w), s. o.), Stärke (1,71 % (w/w), Merck, Darmstadt), Kartoffelstärke (1,71 % (w/w), Feine Speisestärke, Müller's Mühle, Gelsenkirchen) und Inulin (1,9 % (w/w), Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) als Kapselmedium untersucht.

Das Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis des jeweiligen Kapselmediums wurde aus der Elementarzusammensetzung der Einzelkomponenten (Tab. 4. 14) berechnet (Tab. 4. 15), die jedoch nur als Näherungswerte betrachtet werden können, da sie je nach Kulturbedingung und Wachstumsstadium starken Schwankungen unterliegen (Dellweg 1987).

Tab. 4. 14 Elementarzusammensetzung der Medienbestandteile zur Optimierung der Sporulation.

Medienbestandteil	% (w/w) auf TS	
	C	N
Glucose ( $C_6H_{12}O_6$ , 180 g/mol)	40	-
Hefeextrakt <sup>1), 2)</sup>	-	7
Bäckerhefe(zellen) <sup>1)</sup>	46,9	8,4
(Kartoffel-)Stärke ( $(C_6H_{10}O_5)_n$ , 162 g/mol)	44,4	-
Inulin (ca. 180 g/mol)	40	-

1) Dellweg 1987

2) nur verwertbares N berücksichtigt

Tab. 4. 15 Berechnung der C/N-Verhältnisse der zur Optimierung der Sporulation eingesetzten Kapselmedien.

Nr.	Medienbestandteil	% (w/w)	TS / g	C / g	N / g	C/N
1	Bäckerhefe	3,0	0,9	0,4221	0,0756	5,6
2	Hefeextrakt	0,5	0,5	-	0,0350	23
	Glucose	2,0	2,0	0,8000	-	
3	Hefeextrakt	0,1	0,1	-	0,007	114
	Glucose	2,0	2,0	0,8000	-	
4	Bäckerhefe	0,25	0,075	0,0352	0,0063	114
	(Kartoffel-)Stärke	1,71	1,54	0,6911	-	
5	Bäckerhefe	0,25	0,075	0,0352	0,0063	114
	Inulin	1,9	1,7	0,6800	-	

#### 4. 6. 1. 2 Calciumalginatvollkugeln

Zum Vergleich der SEC/PDADMAC-Hohlkugeln mit Calciumalginatvollkugeln wurden Alginatkugeln durch Eintropfen einer Mischung aus 2 % (w/w) Natriumalginat (Protanal LF 20/60, Pronova Biopolymer, Damme, Norwegen), 3 % (w/w) Bäckerhefe und 1 % (w/w) Biofeuchtmasse in eine Lösung mit 1 % (w/w) Calciumchlorid hergestellt. Die Vorbereitung und Durchführung der Versuche entsprach 4. 6. 1. 1. Zum Vergleich wurden SEC/PDADMAC-Hohlkugeln mit 3 % (w/w) Bäckerhefe und 1 % (w/w) Biofeuchtmasse hergestellt (s. 4. 6. 1. 1; Abb. 5. 42 und 5. 43).

#### 4. 6. 2 Kapselherstellung für Pathogenitätstests

Die für die Pathogenitätstests (s. 4. 10 und 5. 5) an der BBA in Münster benötigten Kapselmengen wurden mit Hilfe einer speziellen in Eigenbau hergestellten Verkapselungsapparatur bereitgestellt (Abb. 4. 9).

Um möglichst kleine Kapseln von bis zu 300 µm herstellen zu können, wurde die Spitze der Eintropfapparatur mit einer Messinghülse versehen (Abb. 4. 9 Nr. 10), die eine sechskantige Öffnung besitzt und so angepaßt ist, daß ein genau parallel zur Eintropfkanüle verlaufender Luftstrom ohne große Verwirbelungen entsteht. Die Spitzen der verwendeten Kanülen (Ø 1,2 mm, Länge 40 mm) wurden zusätzlich durch Abschleifen begradigt.

Auch bei der Kapselherstellung für die Pathogenitätstests kamen in allen Versuchen SEC und PDADMAC Nr. 1 mit einer Endkonzentration von 2 % zum Einsatz. Der pH-Wert aller Lösungen wurde vor dem Autoklavieren mit 2,5 M Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt.

Vor den Verkapselungsversuchen wurde die gesamte Apparatur einschließlich der Schläuche und Sterilfilter autoklaviert. Die Medienbestandteile und die Polymerlösungen wurden wie unter 4. 6. 1. 1 angesetzt und getrennt autoklaviert.

Zur Herstellung des SEC-Polymergemisches zum Eintropfen wurde die SEC-Lösung mit den Kapselmedienbestandteilen und der entsprechenden Menge Biofeuchtmasse vermischt und mit einem Wischer durch ein Sieb (Maschenweite 300 µm) gedrückt. Das SEC-Polymergemisch wurde anschließend in die Verkapselungsapparatur gegeben und in die PDADMAC-Lösung eingetropft. Die PDADMAC-Lösung wurde bei 200 UpM mit einem Rührkern (Länge 4,5 cm) gerührt. Bei einem Druck von oben von 1 bar und einem seitlichen Abblasdruck von 1,5 bar entstehen beim Eintropfen in die 2 %-ige PDADMAC-Lösung Kapseln mit einem Durchmesser von 0,3 - 1 mm. Durch Variation der Drücke können die Kapselgröße und die Durchsatzmenge in weiten Bereichen beeinflußt werden.

Verstopfungen der Kanüle konnten meistens mit einem feinen Draht behoben werden, der zuvor in einer Brennerflamme sterilisiert wurde. In ein 1 l-Becherglas mit 500 ml PDADMAC-Lösung wurden zwei Füllungen der Verkapselungsapparatur (etwa 2 x 150 ml) eingetropft.

Zur Abtrennung der Kapseln wurde ein Metallsieb (Ø 8 cm, Maschenweite 500 µm) verwendet. Wenn die Kapseln wasserlösliche niedermolekulare Substanzen wie z. B. Hefeextrakt enthielten, die aus den Kapseln diffundieren können, wurden diese Komponenten auch der PDADMAC-, der Wasch- und der Lagerungslösung in gleicher Konzentration zugesetzt. War dies nicht der Fall, wurde steriles Leitungswasser zum Waschen und Lagern der Kapseln verwendet.

Für eine Kontaminationskontrolle wurden etwa 15 - 20 Kapseln auf Standard I-Nähragar (s. 4. 4. 1) ausgelegt. Ein Vitalitätstest wurde durch Auslegen von 15 - 20 Kapseln auf Wasser-Agar durchgeführt.

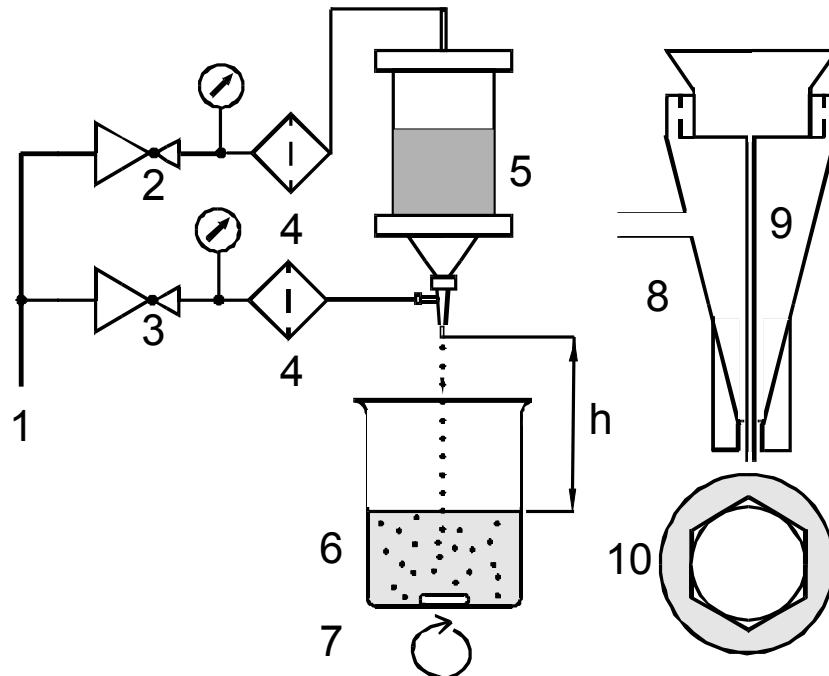


Abb. 4. 9 Eintropfapparat.

- 1: Druckluftzuleitung
  - 2: Druckminderer und Manometer für den Druck von oben
  - 3: Druckminderer und Manometer für den seitlichen Abblasdruck
  - 4: Sterilfilter (0,22  $\mu\text{m}$ )
  - 5: Verkapselungsapparatur (Volumen ca. 150 ml)
  - 6: 1 l-Becherglas mit 500 ml 2 % (w/w) PDADMAC-Lösung
  - 7: Magnetrührer (200 UpM)
  - 8: Aufsatz für den seitlichen Abblasdruck
  - 9: Kanüle ( $\varnothing$  1,2 mm, Länge 40 mm, ohne Spitze)
  - 10: Hülse zur Herstellung besonders kleiner Kapseln
- h = 10 cm

## 4.7 Trocknung der Kapseln

Für einen Einsatz in der Praxis sollten die Pilzkapseln getrocknet und gelagert werden können. Dazu sollten die häufig als Hilfsstoff verwendeten Substanzen Trehalose und Aktivkohle auf ihre Verwendung hin überprüft werden (s. 3. 8). Die Kapseln wurden hergestellt, wie unter 4. 6. 1. 1 beschrieben. Sie enthielten zusätzlich 1 % (w/w) Trehalose bzw. 0,2 % (w/w) Aktivkohle (vgl. 3. 8).

Im Exsikkator wurden gleichzeitig von vier jeweils parallel hergestellten Kapselsorten je 10 g in Petrischalen mit Nocken bei 15 bis 25 mbar über 750 g trockenem Silicagel für mindestens 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. Da das verwendete Silicagel im trockenen Zustand 10 % (hier 75 g) seiner Masse als Wasser aufnehmen kann, hier aber aus den Kapseln, die überwiegend nur aus Wasser bestehen, insgesamt nur knapp 40 g Wasser entfernt werden müssen, war Silicagel im „Überschuß“ vorhanden.

Da die Vitalität getrockneter Biomasse besonders gut bei einer Restfeuchtigkeit von etwa fünf Prozent gewährleistet ist (Hoffmann 1999, s. 3. 7), wurde das Gewicht der Kapseln vor ( $m_{K,t_0}$ ) sowie während ( $m_{K,t}$ ) der Trocknung im Exsikkator überprüft und jeweils die Restfeuchtigkeit bestimmt, bis etwa fünf Prozent Restfeuchte erreicht waren:

$$GF = 1 - \frac{m_{K,trocken}}{m_{K,t_0}} \quad (4. 12)$$

$$RF = 1 - \frac{m_{K,t_0}}{m_{K,t}} \cdot (1 - GF) \quad (4. 13)$$

GF	= Gesamtfeuchtigkeit
RF	= Restfeuchtigkeit
$m_{K,trocken}$	= Masse der trockenen Pilzkapseln
$m_{K,t_0}$	= Masse der Pilzkapseln zum Zeitpunkt $t_0$
$m_{K,t}$	= Masse der Pilzkapseln zum Zeitpunkt $t$

Ein Teil der getrockneten Kapseln wurde für einen Vitalitätstest verwendet (s. 4. 8), mit den übrigen Kapseln wurde ein beschleunigter Lagerungstest (s. 3. 7) durchgeführt, bei dem die Kapseln im Dunkeln für 72 Stunden bei 50 °C gelagert wurden, was einer 25jährigen Lagerung bei 10 °C entspricht. Danach wurden auch diese Kapseln für einen Vitalitätstest auf Wasser-Agar ausgelegt (s. 4. 8).



## 4. 8 Auswachsversuche

Das Auswachsverhalten von *Hirsutella rhossiliensis* aus den Kapseln wurde durch Auslegen auf Wasser-Agar (pH 6,0) untersucht. Bewertet wurde das Auswachsen zu einem Zeitpunkt nach dem Durchmesser des kreisförmigen Myzelhofes um die Kapseln.

Für 20 Petrischalen ( $\varnothing$  85 mm, mit Nocken) wurden in einer 1 l-Flasche 7,5 g Agar-Agar (Merck, Darmstadt) in 492,5 g deionisiertem Wasser gelöst und mit 2,5 M Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH 6 eingestellt. Vor dem Gießen wurden 25 ppm Penicillin und 25 ppm Streptomycin zugegeben (s. 4. 4. 1).

Ausgelegt und ausgemessen wurden je Variation etwa 20 Kapseln. Die Agar-Platten wurden bei 20 °C und etwa 75 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert (Heraeus BK 5060 E, Heraeus, Hanau). Die Luftfeuchtigkeit wurde mit einem offenen Gefäß mit einer gesättigten NaCl-Lösung mit NaCl-Überschuß am Boden eingestellt (Lide 1992). Etwa alle 2 bis 3 Tage wurde mit einer Stereolupe (Stereomikroskop SV8, Carl Zeiss, Oberkochen) bei 10-facher Vergrößerung der Durchmesser des kreisförmig auswachsenden Myzels gemessen. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 35 Tage.

Die gemessenen Myzeldurchmesser wurden gemittelt und die Standard-Abweichung entsprechend Gl. 4. 1 bestimmt. Da die Standard-Abweichung der verschiedenen Kapselsorten in einem Versuch immer sehr ähnlich war, wird sie bei der Darstellung der Ergebnisse jeweils immer nur für eine Kapselsorte angegeben.

#### 4.9 Bestimmung der gebildeten Sporen

Zur Bestimmung der vom Pilzmyzel gebildeten Sporen wurden mindestens 20 auf Wasseragar ausgewachsene Kapseln fünf Mal mit je 5 ml Ethanol auf der Agarplatte abgewaschen, die Sporensuspension zur Abtrennung von Pilzmyzel und Verunreinigungen im Membranpumpenvakuum (15-20 mbar) durch eine Glasfritte (Filterrohr, Porosität P 16 nach ISO 4793, 10 – 16  $\mu\text{m}$ ) filtriert und das Filtrat im Trockenschrank über Nacht bei 80 °C eingedampft. Nach Resuspension mit 2 ml 0,01 % (w/w) Triton-X-Lösung wurden die Sporen mit einer Zählkammer (Fuchs-Rosenthal, Tiefe 0,2 mm) unter dem Mikroskop ausgezählt. Die ellipsoiden Konidiosporen hatten eine Länge von etwa 8  $\mu\text{m}$  und einen Umfang von etwa 5  $\mu\text{m}$  (vgl. 3. 7).

Da unter dem Mikroskop nur „frische“ runde Sporen gezählt werden können, werden abgefallene und keimende Sporen nicht berücksichtigt. Als Maß dient die Anzahl der gebildeten Sporen pro Kapsel.

## 4. 10 Pathogenitätstests

Mit den in dieser Arbeit hergestellten und optimierten Kapseln wurden am Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde Münster der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) Pathogenitätstests mit dem Zuckerrüben nematoden *Heterodera schachtii* durchgeführt, die Bestandteil einer eigenständigen Arbeit sind (Gutberlet 2000).

Neben vielen begleitenden Untersuchungen wurden mit den Pilzkapseln im wesentlichen Biotests (Topfversuche) und Kleinparzellen-Freilandversuche (Microplots) durchgeführt.

Bei den Biotests wurden für jedes Versuchsglied 20 Plastikfaltschachteln (Volumen 100 ml) mit sandiger Felderde gefüllt. Die Erde war nicht steril, aber frei von Nematoden und nematodenparasitären Pilzen. Die Pilzkapseln (meistens 4 g feuchte Kapseln), pilzfreie Kapseln und freier Pilz wurden vorher mit der Erde vermischt. Die Bodenfeuchte wurde auf 12 % eingestellt. In jeder Faltschachtel wurde ein Zuckerrübensamen der *Heterodera schachtii*-anfälligen Sorte „Patricia“ gesät. Die Schachteln wurden bei 17 °C am Tag und 15 °C in der Nacht gelagert. Nach sieben Tagen wurden je Schachtel 1.000 oberflächensterilisierte Nematodenlarven zugegeben. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Zuckerrübenpflänzchen aus den Schachteln entfernt und die Wurzel ca. 5 cm unterhalb des Hypokotyls abgetrennt. Nach Anfärbung wurden die in die Wurzel eingedrungenen Nematodenlarven gezählt. Als Maß für den Nematodenbefall diente die Anzahl der Larven pro cm Wurzel.

Für die Kleinparzellen-Freilandversuche (Microplots, 1 m x 1 m x 0,8 m) wurde je Versuchsglied eine Parzelle bis in eine Tiefe von 30 cm gleichmäßig mit Zysten von *Heterodera schachtii* verseucht, so daß zu Versuchsbeginn 1.000 Eier und Larven (in Zysten) und 250 bereits geschlüpfte Larven je 100 g Boden vorhanden waren. Je Microplot wurden 25 Zuckerrüben der Sorte „Patricia“ gesät. Im ersten Microplot-Versuch wurde der ganze Boden bis zu einer Tiefe von 10 cm mit Pilzkapseln bzw. freiem Pilz vermischt. Im zweiten Microplot-Versuch wurde dagegen nur ein Zylinder (Länge 15 cm, Ø 5 cm, Volumen ca. 300 ml) um den Zuckerrübensamen herum mit Pilzkapseln bzw. freiem Pilz vermischt. Ein Teil der Rüben wurde bereits nach drei Wochen wieder geerntet, um den Nematodenbefall der Wurzeln zu bestimmen. Die übrigen Rüben dienten zu einer Ertragsbestimmung am Ende der Wachstumsperiode. Nach Untersuchung von Bodenproben am Versuchsende wurde die Vermehrung der Nematoden bestimmt.

## **5 Ergebnisse und Diskussion**

### **5. 1 Optimierung der mechanischen Stabilität der Hohlkugeln**

In der Biotechnologie werden schon seit langer Zeit Enzyme oder ganze Zellen immobilisiert. Eine besondere Form der Immobilisierung stellt der Einschluß bzw. die Verkapselung von biologischem Nutzmaterial dar (Vorlop und Klein 1983; Klein und Vorlop 1985). Neben dem Schutz und der Rückhaltung des Nutzmaterials kann mit verkapselten Systemen auch dessen kontrollierte Freisetzung realisiert werden, was gerade in der biologischen Schädlingsbekämpfung von besonderem Interesse ist, da der Einsatz der freien Organismen in der Regel nicht erfolgreich ist (Stirling 1991, Siddiqui und Mahmood 1996; Patel 1998). Eine Formulierung soll darüber hinaus auch eine Lagerung und die einfache Ausbringung der Organismen ermöglichen (Stirling 1988 a, 1991; Stirling und Mani 1995).

Aufgrund des hohen Preises sind Alternativen zur klassischen Formulierung mit Alginat gerade bei einem massenweisen Einsatz in der biologischen Schädlingsbekämpfung wünschenswert (Fravel *et al.* 1998). Dies gilt insbesondere für den Einsatz im Boden, da Alginat als Nahrungsquelle das Wachstum unerwünschter Mikroorganismen fördern kann (Lohmann 1989; Cassidy *et al.* 1996). In Versuchen mit Kartoffeln ist es durch den Einsatz von Alginat zu einer negativen Beeinflussung des Wurzelwachstums gekommen (Lohmann 1989; Schuster und Sikora 1992).

Der Einsatz von Hohlkugeln zur Immobilisierung ist aufgrund ihres flüssigen, wäßrigen Kerns besonders bei empfindlichem biologischem Material vorteilhaft, da die Struktur von Biomolekülen wenig beeinflusst wird (Pommering *et al.* 1983). Hohlkugeln haben sich auch zur Verkapselung ganzer Zellen bewährt. So wurden z. B. Langerhanssche Inseln zur Behandlung von Diabetes in Hohlkugeln verkapselt, die ausgehend von Calciumalginatvollkugeln mit zusätzlichen Schichten aus Poly-L-Lysin und Alginat und anschließendes Auflösen des Calciumalginatkerns hergestellt wurden (Lim und Sun 1980; Lim und Moss 1981; Goosen und Sun 1985). In nur einem Schritt und damit wesentlich einfacher wurden tierische Zellen erfolgreich in Calciumalginathohlkugeln verkapselt, wobei die Zellen mit Methylcellulose und Calciumchlorid gemischt und anschließend in eine verdünnte Natriumalginatlösung eingetropft wurden (Spiekermann *et al.* 1987).

Besonders elegant können Hohlkugeln auf Basis von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen hergestellt werden (Dautzenberg *et al.* 1985, 1994). Für ihren Einsatz in der Praxis sollten neben der Biokompatibilität und eventuell der Sterilisierbarkeit der Kugelmaterien auch deren einfache und preiswerte Herstellung in konstanter Produktqualität und eine gute Modifizierbarkeit gewährleistet sein. Eine große Zahl möglicher Materialien wurde bereits auf ihre Eignung zur Mikroverkapselung hin untersucht (Prokop *et al.* 1998 a, b). Zur Herstellung von Hohlkugeln gilt dabei Cellulosederivaten ein besonderes Interesse. Insbesondere von Dautzenberg wurde in der

Vergangenheit Natrium-Cellulosesulfat intensiv untersucht (Dautzenberg *et al.* 1985, Yao *et al.* 1993; Dautzenberg *et al.* 1994, 1996).

Mit Sulfoethylcellulose (SEC) steht ein anderes interessantes Cellulosederivat zur Verfügung, das sich problemlos auch im technischen Maßstab in reproduzierbarer Qualität herstellen läßt (Herzog *et al.* 1989).

Ziel ist die Herstellung mechanisch stabiler Hohlkugeln auf Basis von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen unter Verwendung von Sulfoethylcellulose (SEC) als Polyanion zur besonders schonenden Mikroverkapselung von Zellen, Enzymen und anderem Nutzmaterial, hier im speziellen dem nematophagen Pilz *Hirsutella rhossiliensis*.

Als Maß für die mechanische Stabilität wird die Kraft verwendet, die aufgewendet werden muß, um die Hohlkugel zum Zerplatzen zu bringen. Dazu werden nacheinander mindestens 10 Hohlkugeln auf einer Kraftmeßdose zerdrückt und die aufgewendete Kraft aufgezeichnet. Dabei ist wichtig, daß die Kapseln schnell zerdrückt werden, da bei langsamer Krafteinwirkung Wasser aus dem Innern der Hohlkugel durch die Membran gepreßt wird, ohne daß die Kapsel zerplatzt (s. 4. 3).

Die Standardabweichung der Kapselstabilitätsmessungen lag für SEC/PDADMAC-Kapseln bei Lagerung in deionisiertem Wasser im Bereich von 0,1 bis 1,3, in physiologischer NaCl-Lösung zwischen 0,1 und 0,3 und für SEC/Chitosan-Kapseln zwischen 0,1 und 0,5 bzw. 0,1 und 0,4.

Sowohl die für SEC/PDADMAC-Kapseln mit 7 N als auch die für SEC/Chitosan-Kapseln mit 4,4 N im Rahmen dieser Arbeit gemessenen mechanischen Stabilitäten liegen weit über den experimentell auf sehr ähnliche Weise bestimmten Stabilitäten (vgl. 4. 3) von CS/PDADMAC-Kapseln, deren mechanische Festigkeit mit durchschnittlich 1 bis 1,5 N, maximal mit 2,5 N angegeben wird (Wiesmann 1994; Dautzenberg *et al.* 1996).

### 5. 1. 1 Kapseln aus SEC und PDADMAC

Die hier untersuchten Kapseln ( $\varnothing$  ca. 2,5 – 2,7 mm) entstehen durch Eintropfen einer wäßrigen Lösung des Polyanions SEC in die wäßrige Lösung des Polykations Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC). Abb. 5. 1 zeigt zwei REM-Aufnahmen eines Schnittes durch die Kapselmembran. Die Innenseite der Kapsel befindet sich jeweils links im Bild. Nach innen hin weist die Membran eine immer lockerer aufgebaute Struktur auf. Die Kapselmembran wächst wie bei der Verwendung von Cellulosesulfat (Dautzenberg *et al.* 1994, 1996) ausgehend von der Primärmembran, die sich sofort nach Kontakt des SEC-Tropfens mit der Vernetzerlösung bildet, nach innen, bis es zu einer Verarmung an SEC im Innern kommt, oder bis der Diffusionswiderstand so groß geworden ist, daß die äußere Komponente die Membran

nicht mehr durchdringen kann. Die 50 – 60  $\mu\text{m}$  dicke Membran umschließt den flüssigen Kern der Hohlkugel.

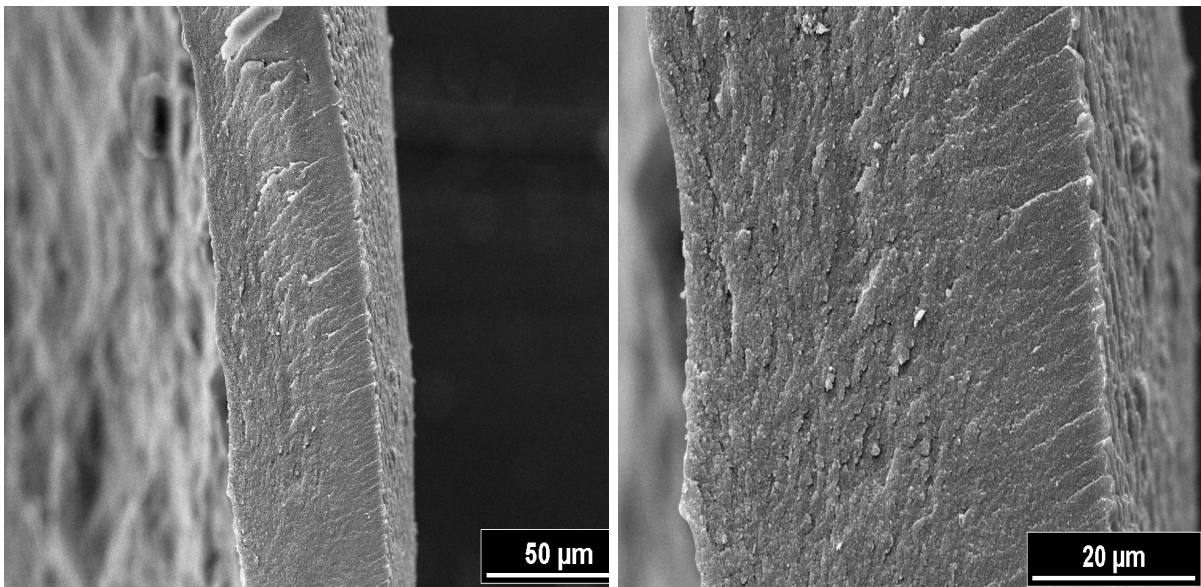


Abb. 5. 1 REM-Aufnahmen der aus SEC und PDADMAC Nr. 2 gebildeten Kapselmembran (Wolff Walsrode AG).

Für die Bildung mechanisch stabiler Hohlkugeln müssen beide Komponenten hinsichtlich ihrer Polymercharakteristik (Molmasse, Molmassenverteilung, Ladungsdichte) aufeinander abgestimmt sein (vgl. Dautzenberg *et al.* 1996). Nach zahlreichen Vorversuchen im Rahmen eines intensiven Screenings haben sich z. B. eine SEC mit einer Molmasse von 132.600 g/mol und einem Substitutionsgrad von 0,42 und ein PDADMAC (Ladungsdichte 100 %) mit einer mittleren Molmasse von 60.800 g/mol (s. Tab. 4. 2 PDADMAC Nr. 2) als geeignet erwiesen. Dautzenberg *et al.* 1996 haben bei Verwendung des chemisch ähnlichen Cellulosesulfates an Stelle der SEC festgestellt, daß der Substitutionsgrad zwischen 0,25 und 0,65 liegen sollte. Mit einem PDADMAC einer mittleren Molmasse von 34.500 g/mol (s. Tab. 4. 2 PDADMAC Nr. 1) wurden ebenfalls brauchbare Kapseln erhalten, ihre mechanische Stabilität war jedoch in allen Messungen um etwa 20 bis 25 % geringer, so daß hier nur Ergebnisse aus Versuchen mit PDADMAC Nr. 2 dargestellt werden.

PDADMACs mit 16.000, 32.000 und 54.000 g/mol, die von C. Wandrey vom Institut für Polymerchemie und Biomaterialien der Eidgenössischen Technischen Hochschule Lausanne, Schweiz zur Verfügung gestellt wurden, lieferten Kapseln mit nur 1 bis 2 N, bei Verwendung eines PDADMAC mit 90.000 g/mol wurden keine Kapseln erhalten.

Bei den Vorversuchen wurden nur dann Kapseln erhalten, wenn der Substitutionsgrad der SEC zwischen 0,2 und 0,9 lag.

Die mechanische Stabilität der gebildeten Kapseln hängt weiterhin von der Reaktionszeit bzw. Vernetzungszeit ab. Die Vernetzungszeit ist die Zeit, die die eingetropften Kugeln in der Vernetzerlösung verbleiben, bevor sie entnommen und gewaschen werden. Das Ende der Vernetzung deutete sich in den meisten Fällen dadurch an, daß die Hohlkugeln eine kleine Vertiefung bekamen und zu schrumpfen begannen. Vorversuche haben gezeigt, daß die Kugeln kurz vor dem Schrumpfungsbeginn ihre höchste Stabilität besitzen. Die Vernetzungszeiten hingen stark von den verwendeten Konzentrationen beider Polymere ab. Deshalb verblieben die Kugeln im Vernetzerbad bis sich die Schrumpfung andeutete, jedoch maximal 60 Minuten, wenn keine Schrumpfung erfolgte.

Untersuchungen zum Umsatzgrad (Wolff Walsrode AG) zeigten, daß ab PDADMAC-Konzentrationen von 4 % ein Umsatz von bis zu 100 % erreicht wurde. Dazu wurden die Kapseln zerdrückt, die nach der Vernetzung in der Kapsel noch vorhandene SEC mit Methylenblau komplexiert und über die Extinktion die Restkonzentration spektrophotometrisch bestimmt.

#### 5. 1. 1. 1 Konzentrationsscreening

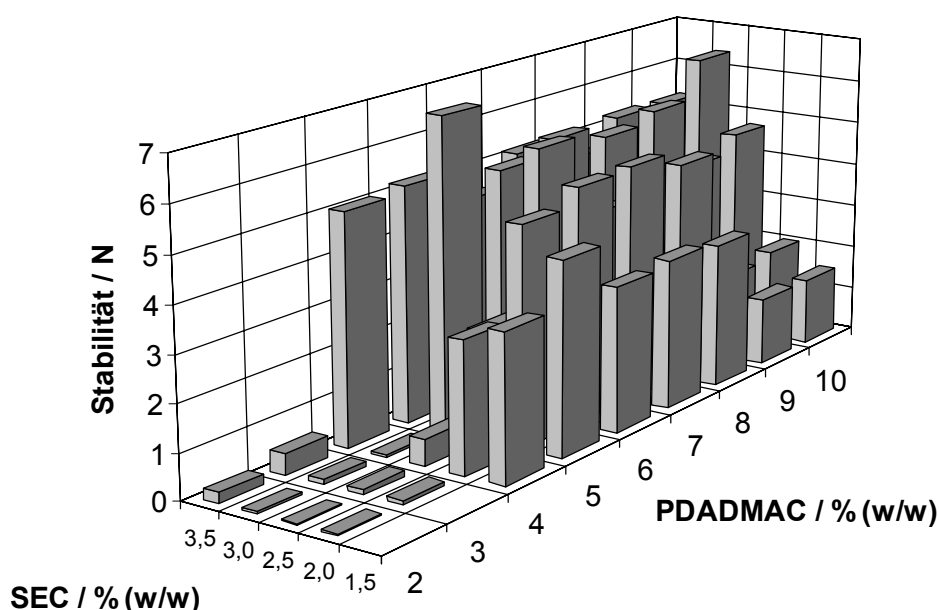


Abb. 5. 2 Einfluß der Konzentration der Polymerlösungen auf die mechanische Kapselstabilität (PDADMAC Nr. 2, Lagerung in deion. Wasser).

Die Konzentrationen der Polymerlösungen spielen bei der Bildung mechanisch stabiler Hohlkugeln eine entscheidene Rolle (Abb. 5. 2). Mechanisch stabile Hohlkugeln von bis zu 7 N wurden z. B. bei SEC-Konzentrationen von mehr als 2 % und Vernetzerkonzentrationen von 4 % und mehr erhalten. Beim Eintropfen einer 1,5 %igen SEC-Lösung in eine 2 bzw. 3 %ige PDADMAC-Lösung wurden keine Kapseln er-

halten. SEC-Lösungen mit einer Konzentration von mehr als 3,5 % sind bereits so viskos, daß sie nicht mehr eingetropft werden können.

Alle folgenden Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 3 % (w/w) SEC in 5 % (w/w) PDADMAC und Lagerung in deionisiertem Wasser durchgeführt.

### 5. 1. 1. 2 Einfluß der Lagerungslösung

Wurden die Hohlkugeln statt in Wasser in einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9 % (w/w) NaCl) gelagert, fielen die Stabilitäten um etwa 80 % geringer aus (Abb. 5. 3).

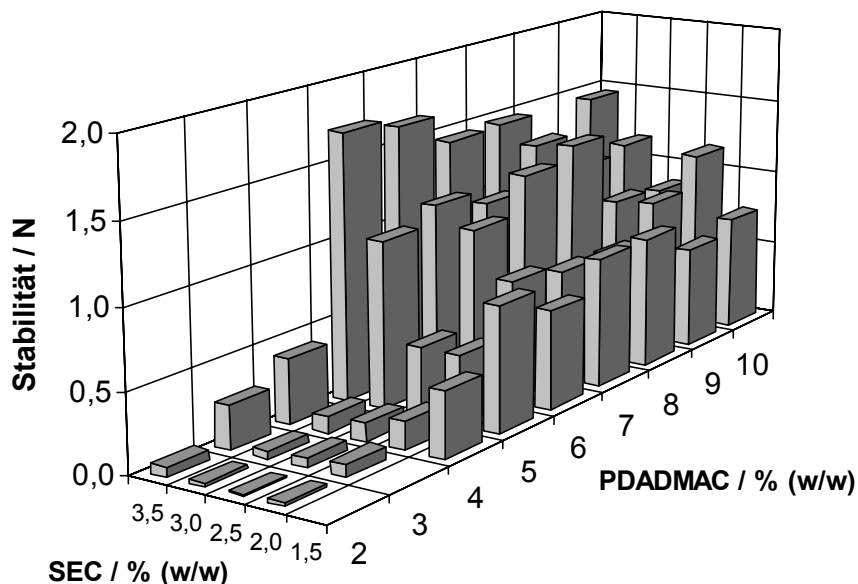


Abb. 5. 3 Einfluß der Konzentration der Polymerlösungen auf die mechanische Kapselstabilität (PDADMAC Nr. 2, Lagerung in 0,9 % (w/w) NaCl).

Die Stabilitätsminderung ist fast reversibel. Abb. 5. 4 zeigt die Stabilität von Hohlkugeln, die entweder erst zehn Tage in deionisiertem Wasser gelagert wurden und dann in eine physiologische Kochsalzlösung gegeben wurden oder erst zehn Tage in physiologischer Kochsalzlösung lagen und dann in deionisiertes Wasser gegeben wurden.



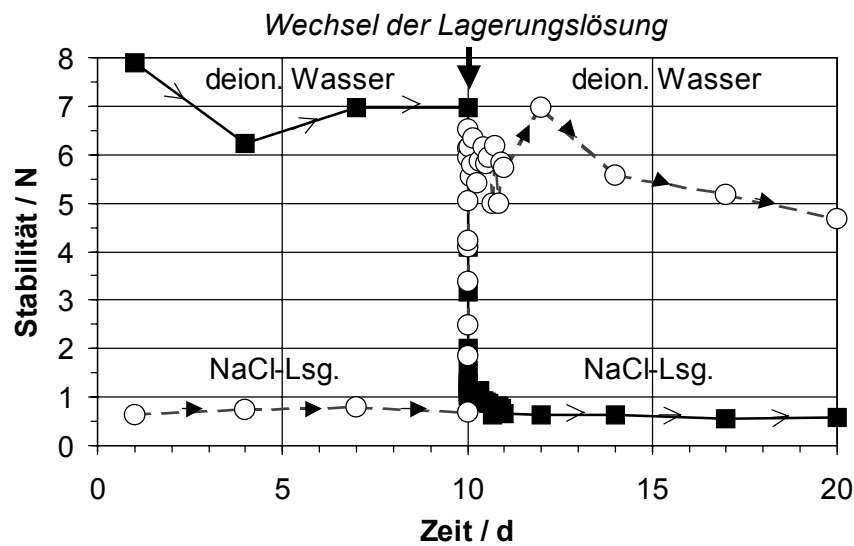


Abb. 5. 4 Änderung der mechanischen Kapselstabilität beim Wechsel der Lagerungslösung (deion. Wasser  $\leftrightarrow$  0,9 % (w/w) NaCl, PDADMAC Nr. 2).

In einem anderen Versuch wurde die Lagerungslösung über 25 Tage täglich gewechselt (Abb. 5. 5). Hier nahm die Stabilität der Hohlkugeln nach drei Wechseln der Lagerungslösung um 25 % ab und blieb danach konstant.

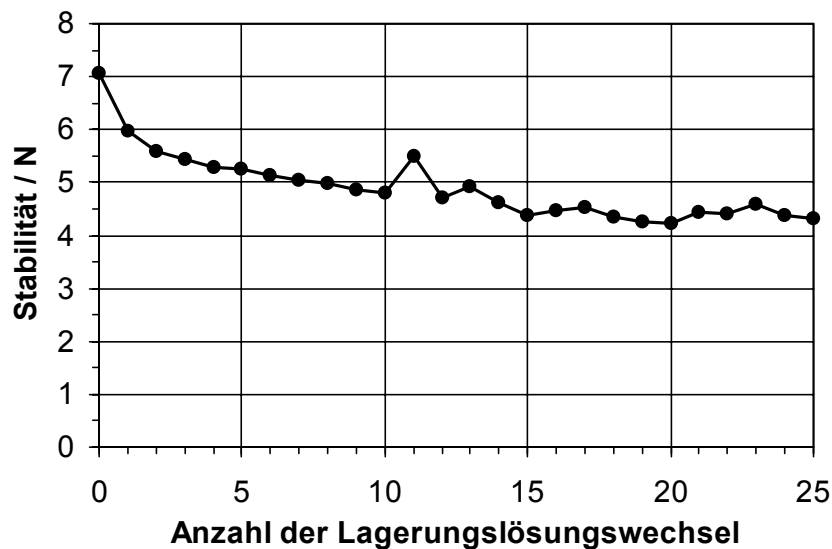


Abb. 5. 5 Einfluß eines täglichen Lagerungslösungswechsels auf die mechanische Kapselstabilität (deion. Wasser  $\leftrightarrow$  0,9 % (w/w) NaCl, PDADMAC Nr. 2).

Neben der mechanischen Stabilität ändert sich auch die Größe der Kapseln, wobei auch diese Änderung reversibel ist (Abb. 5. 6).

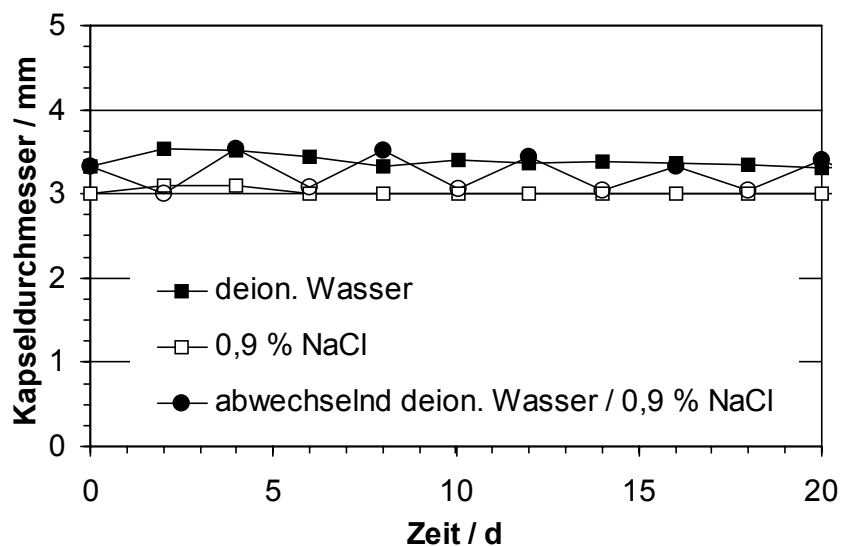


Abb. 5. 6 Einfluß der Lagerungslösung auf die Größe der Kapseln (PDADMAC Nr. 2).

Über die Ursachen für die Verringerung der mechanischen Stabilität und der Größe der Kapseln in Gegenwart von salzhaltigen Medien kann nur spekuliert werden.

Da Salzionen und selbst größere Moleküle wie z. B. Proteine aus Hefeextrakt (s. u.) die Kapselmembran problemlos passieren können, scheiden Erklärungen mit osmotischen Effekten aufgrund des DONNAN-Gleichgewichts nahezu aus. SEC-Reste, die nicht an der Reaktion zur Bildung der Kapselwand beteiligt waren, in der Kapsel verbleiben und osmotische Effekte bewirken könnten, wurden nicht nachgewiesen (s. o.). Überschüssige SEC im Innern findet sich erst bei größeren Kapseln (s. 5. 1. 1. 3).

Fällungen von Symplexen aus unterschiedlichen Polyelektrolyten zeigen in Wasser ein reproduzierbares und reversibles Quellverhalten, wobei teilweise erhebliche Quellwassermengen aufgenommen werden (Philipp *et al.* 1980, s. 3. 2. 4). Das Quellen der Komplexe ist u. a. auch von der Ionenstärke und der Zusammensetzung des Quellungsmediums abhängig (Peppas und Khare 1993; Khare und Peppas 1995). Die Autoren gehen davon aus, daß kleine Ionen in das Polymer-Netzwerk diffundieren und dadurch ein osmotischer Druck entsteht, der Wasser ins Netzwerk zieht und schließlich zur Quellung führt. Das Quellen bewirkt eine Vergrößerung des Abstandes der geladenen Gruppen der Polyelektrolyte in der Membran, wodurch die Membran dicker, weicher und instabiler wird.

Eine vergleichbare Abhängigkeit der mechanischen Kapselstabilität vom Lagerungsmedium wurde auch bei Cellulosesulfat/PDADMAC-Kapseln beobachtet, die jedoch auch nicht weiter erklärt werden konnte (Eberle 1997). Dautzenberg *et al.* (1996) vermuten zwar osmotische Effekte aufgrund des DONNAN-Gleichgewichts, haben aber die Zusammensetzung des Kapselinnern nicht untersucht.

### 5. 1. 1. 3 Variation der Kapselgröße

Die mechanische Stabilität hängt auch von der Kapselgröße ab, wobei ein Maximum bei einem Durchmesser von 2,7 mm durchlaufen wird (Abb. 5. 7).

Die kleineren Kapseln wurden entweder mit feineren Kanülen ( $\varnothing$  0,84; 0,58 oder 0,45 mm statt der sonst verwendeten 1,2 mm) bzw. der Eintropfapparatur hergestellt (s. 4. 6. 2).

Die gefundene Abhängigkeit kann als Summe zweier Effekte interpretiert werden: Mit steigendem Kapseldurchmesser steigt das Kapselvolumen wesentlich stärker an, d. h. SEC-Tropfen mit höherem Durchmesser enthalten aufgrund ihres kleineren Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen entsprechend mehr SEC, die zur Bildung der Kapselmembran zur Verfügung steht (vgl. Dautzenberg *et al.* 1996). Da das PDADMAC die Kapselmembran ab einer bestimmten Dicke nicht mehr durchdringen kann (vgl. CS/PDADMAC, Dautzenberg *et al.* 1983, 1987, 1994), müßte die Kapselstabilität ab einem bestimmten Kapseldurchmesser bei einem konstanten Maximalwert liegen. Die größeren Kapseln sollten überschüssige SEC enthalten, was experimentell auch bestätigt wurde. Ab einer Größe von 2,8 mm wurde die SEC nicht mehr vollständig umgesetzt (vgl. 5. 1. 1). Die Abnahme der Kapselstabilität könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei den größeren Kapseln mit der Zunahme der Oberfläche auch die Wahrscheinlichkeit von Fehlstellen in der Membran steigt.

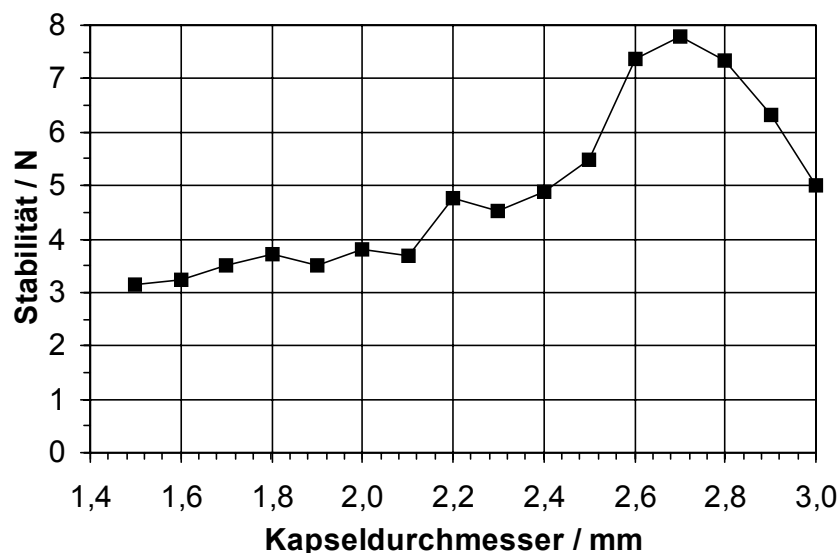


Abb. 5. 7 Abhängigkeit der mechanischen Kapselstabilität vom Kapseldurchmesser (PDADMAC Nr. 2).

#### 5. 1. 1. 4 Weitere Charakterisierung

Eine Abhängigkeit der mechanischen Kapselstabilität vom pH-Wert der SEC-, der PDADMAC- oder der Lagerungslösung konnte im physiologisch interessanten Bereich von pH 3 bis pH 8 nicht gefunden werden. Dies entspricht den Beobachtungen von Philipp *et al.* (1979, 1982), die bei Symplexfällungen von Polyelektrolyten mit großer Säurestärke und großer Basenstärke ebenfalls keinen pH-Einfluß feststellen konnten. Eine Abhängigkeit vom pH-Wert tritt danach nur bei der Symplexfällung von Polyelektrolyten mit geringer Säure- und Basenstärke auf, die in erster Line auf unvollständige Dissoziation der ionischen Gruppen zurückgeführt wird.

Mit dem Aufbringen von bis zu vier zusätzlichen Schichten auf die Membran durch Tränken der Hohlkugeln in verdünnter, 0,5 % (w/w) SEC-Lösung und anschließendes Vernetzen mit verdünnter, 0,5 % (w/w) PDADMAC-Lösung wurde bei einzelnen Kapseln zwar ein geringer Stabilitätsgewinn erreicht, dieser steht jedoch im Einzelfall mit maximal 1 N in keinem Verhältnis zum experimentellen Aufwand.

Für den Einsatz zur Verkapselung von biologischem Material ist häufig eine Sterilisation aller beteiligten Substanzen erforderlich. Kapseln, die aus einer 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck in einer Sattdampfatmosfera autoklavierten SEC- und PDADMAC-Lösung hergestellt wurden, weisen eine um 40 % verminderte mechanische Stabilität auf.

Bei Kapseln, hergestellt aus autoklavierten Polymeren, die außerdem noch 15 % (w/w) Maiskleber, 15 % (w/w) Biofeuchtmasse und 0,5 % (w/w) Hefeextrakt enthielten, verringerte sich die mechanische Kapselstabilität auf etwa 15 % des ursprünglichen Wertes.

#### 5. 1. 2 Kapseln aus SEC und Chitosan

Für einen Ersatz des synthetisch hergestellten PDADMAC als kationisches Vernetzungsmittel für die SEC wurde das auf Basis des weltweit zweitwichtigsten nachwachsenden Rohstoffs Chitin hergestellte Polykation Chitosan auf seine Eignung zur Bildung mechanisch stabiler Kapseln untersucht.

Bei Chitosan fiel nach einer Vorauswahl aus 15 Produkten die Entscheidung für zwei Produkte, ein Produkt mit einer Molmasse von 6.000 g/mol und einem Deacetylierungsgrad von 88% (s. Tab. 4. 3 Chitosan Nr. 1) und ein Produkt in Lebensmittelqualität (s. Tab. 4. 4 Chitosan Nr. 2). Die stabilsten Kapseln bei Verwendung von Chitosan Nr. 2 (2,16 N) ergaben sich bei einer SEC-Konzentration von 3,0 % und einer Chitosan-Konzentration von ebenfalls 3,0 % bei Lagerung in deion. Wasser. Da

mit Chitosan Nr. 1 doppelt so hohe Kapselstabilitäten erreicht wurden (s. u.) und die Verwendung des hoch aufgereinigten Produkts in Lebensmittelqualität für einen massenweisen Einsatz zu teuer ist, werden im folgenden nur Ergebnisse aus Versuchen unter Verwendung von Chitosan Nr. 1 dargestellt.

Im Gegensatz zu PDADMAC ist Chitosan in Wasser nur schwer löslich und kann nur in verdünnten Säuren in Lösung gebracht werden. Das Chitosan wurde in dieser Arbeit in 1 % (w/w) Essigsäure kalt gelöst. Die pH-Werte der SEC- und der Chitosan-Lösung wurden auf 3,5 eingestellt. Die gebildeten Kapseln besitzen im Vergleich zu den SEC/PDADMAC-Kapseln eine wesentlich elastischere Membran.

### 5. 1. 2. 1 Konzentrationscreening

Auch bei den SEC/Chitosan-Kapseln ist die mechanische Stabilität der Hohlkugeln von den Konzentrationen der Polymerlösungen abhängig (Abb. 5. 8). Mit zunehmender SEC-Konzentration nimmt die mechanische Stabilität der Kapseln zu, während die Stabilität der Kapseln in Bezug auf die Chitosan-Konzentration ein Maximum durchläuft, welches sich mit steigender SEC-Konzentration zu höheren Chitosan-Konzentrationen hin verschiebt. Aufgrund der Viskosität können keine SEC-Lösungen mit höheren Konzentrationen als 3,5 % (w/w) zur Bildung runder Kapseln eingesetzt werden. Die stabilsten Kapseln (4,4 N) ergaben sich bei einer SEC-Konzentration von 3,5 % und einer Chitosan-Konzentration von 8,0 %.

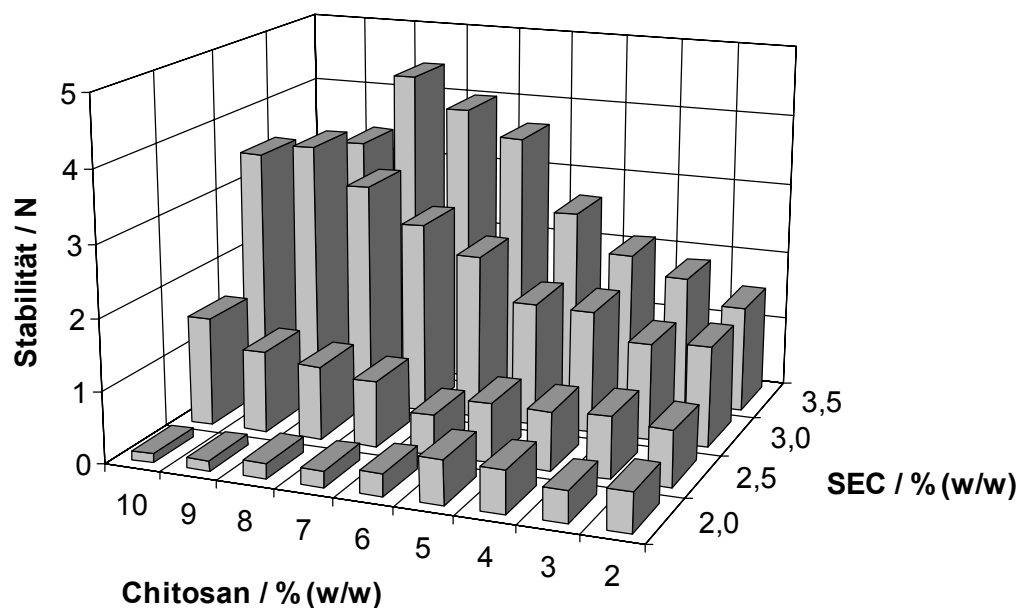


Abb. 5. 8 Einfluß der Konzentration der Polymerlösungen auf die mechanische Kapselstabilität (Chitosan Nr. 1, Lagerung in deion. Wasser).

Auch bei den SEC/Chitosan-Hohlkugeln fallen die Stabilitäten geringer aus, wenn für die Lagerung statt deionisiertem Wasser eine physiologische Kochsalzlösung (0,9 % (w/w) NaCl) verwendet wird (Abb. 5. 9). Die Stabilitätsminderung fällt hier aber mit 25 % wesentlich geringer aus als bei den SEC/PDADMAC-Kugeln (vgl. Abb. 5. 3).

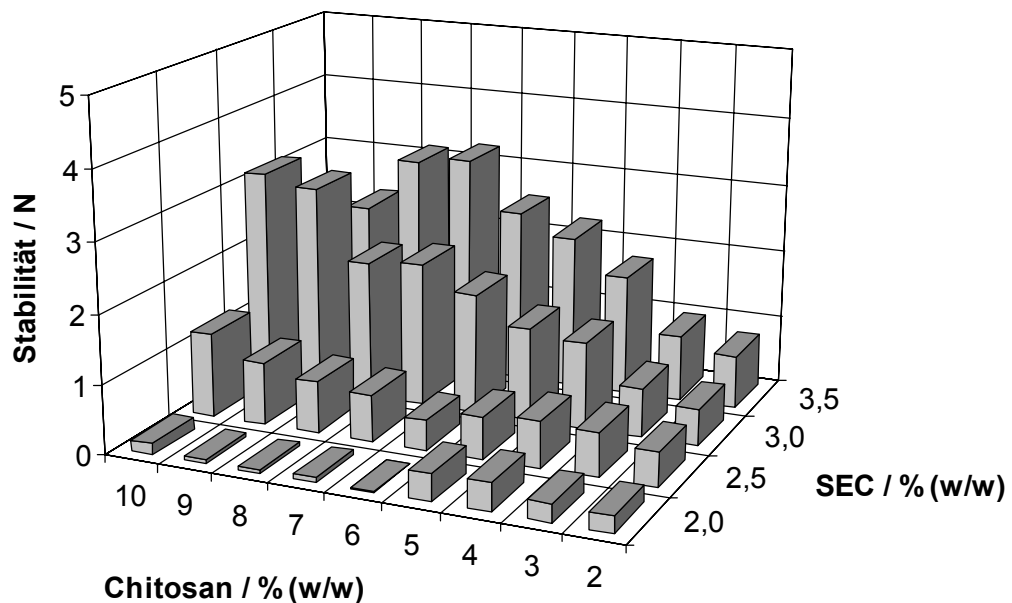


Abb. 5. 9 Einfluß der Konzentration der Polymerlösungen auf die mechanische Kapselstabilität (Chitosan Nr. 1, Lagerung in 0,9 % (w/w) NaCl).

### 5. 1. 2. 2 pH-Screening

Anders als bei der Bildung der SEC/PDADMAC-Hohlkugeln (vgl. 5. 1. 1. 4) spielt der pH-Wert bei Verwendung von Chitosan als Vernetzungsmittel eine wichtige Rolle, da Chitosan ( $pK_s$  6,3) nur nach Protonierung der Aminogruppen als Polykation vorliegt und mit SEC einen Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplex bilden kann. Die stabilsten Kapseln werden erhalten, wenn das Chitosan bei pH 3,5 gelöst und eingetropft wird. Die erhaltenen Kapseln sind bei Lagerung im sauren pH-Bereich am stabilsten (Abb. 5. 10). Bei  $pH > 8$  lösen sich die Kapseln erwartungsgemäß auf.

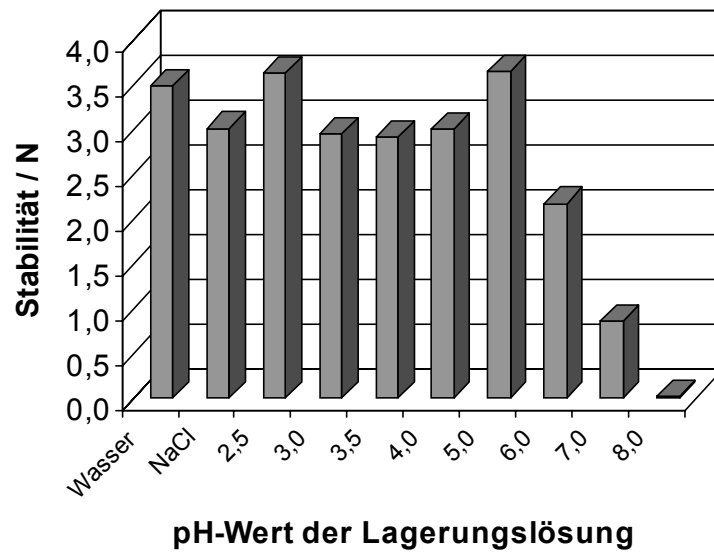


Abb. 5. 10 Abhängigkeit der mechanischen Stabilität vom pH-Wert der Lagerungslösung (3 % SEC in 9 % Chitosan Nr. 1, gelagert in Citronensäure/Phosphat-Puffer).

## 5. 2 Optimierung der Anzucht von *Hirsutella rhossiliensis*

Zur Optimierung der Anzucht von *Hirsutella rhossiliensis* war zuerst die Ermittlung der grundlegenden Wachstumsansprüche wie Temperatur, pH-Wert und wichtiger Medienbestandteile erforderlich, da sie von dem in dieser Arbeit verwendeten Isolat bisher nicht genau bekannt waren (s. 3. 7).

Temperaturanspruch und pH-Wert wurden durch Auslegen von 25 mit Pilz bewachsenen Agarstückchen ( $\varnothing$  5 mm) auf Festmedium der entsprechenden Zusammensetzung bestimmt (s. 4. 4. 2). Das Medium wurde sowohl auf Festmedien also auch in Flüssigkulturen optimiert (s. 4. 4. 3).

Abb. 5. 11 zeigt Myzel von *Hirsutella rhossiliensis* bei Anzucht in Flüssigkultur. Gut zu erkennen sind die im rechten Winkel von den Hyphen abstehenden flaschenförmigen Phialiden, die nur beim Luftmyzel Sporen tragen (s. 3. 7).

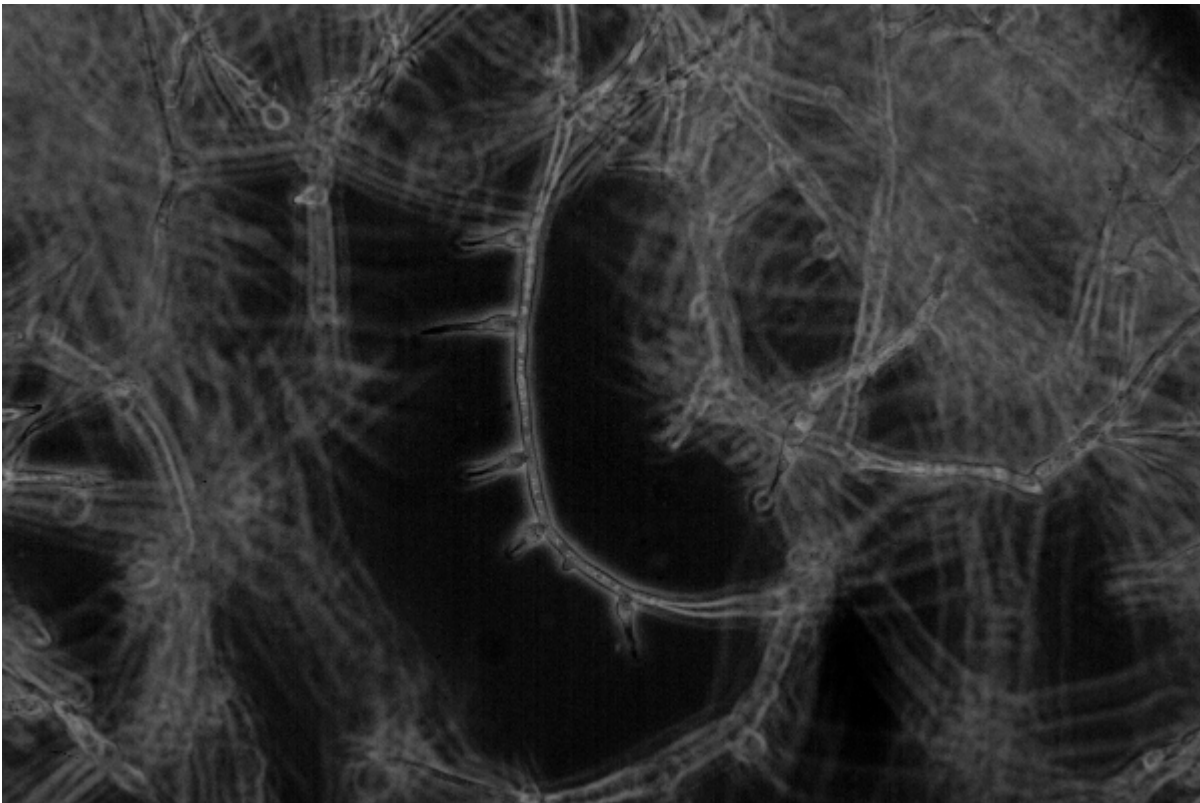


Abb. 5. 11 Myzel von *Hirsutella rhossiliensis* bei Anzucht in Flüssigkultur (1000fache Vergrößerung).

### 5. 2. 1 Wachstumsparameter

Das Temperaturoptimum des in dieser Arbeit verwendeten *Hirsutella rhossiliensis*-Isolates liegt bei 20 °C (Abb. 5. 12 und Abb. 5. 13). Bei einer Temperatur von 30 °C war kein Pilzwachstum mehr zu beobachten. Wurde der Pilz anschließend wieder



bei niedrigeren Temperaturen inkubiert, wuchs er auch wieder entsprechend Abb. 5. 12. Wurde *H. rhossiliensis* einmal Temperaturen von 35 °C oder mehr ausgesetzt, zeigte der Pilz keinerlei Wachstum mehr. Die Beobachtungen entsprechen etwa denen, die für andere *H. rhossiliensis*-Isolate gemacht wurden, für die Temperaturoptima zwischen 20 und 25 °C angegeben werden (s. 3. 7; Jaffee und Zehr 1985; Tedford *et al.* 1995; Velvis und Kamp 1996).

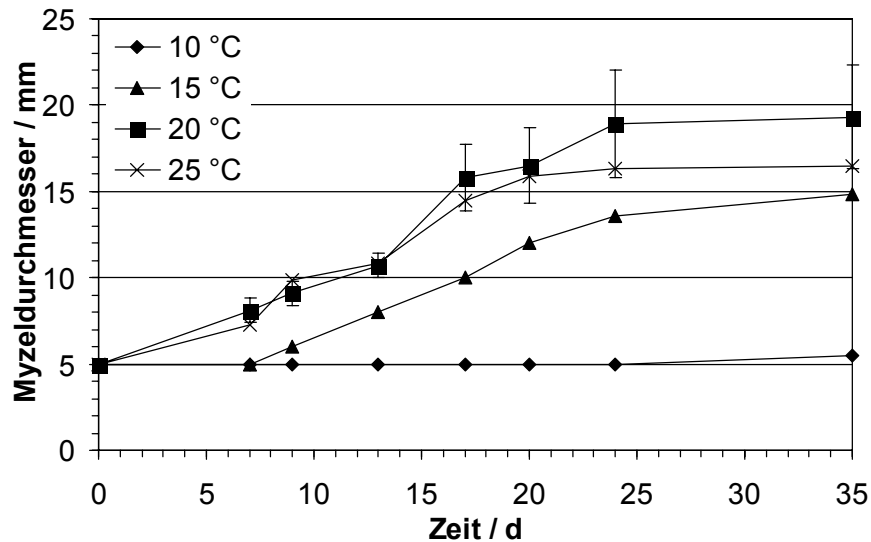


Abb. 5. 12 Wachstum bei verschiedenen Temperaturen (GNA, pH 6).

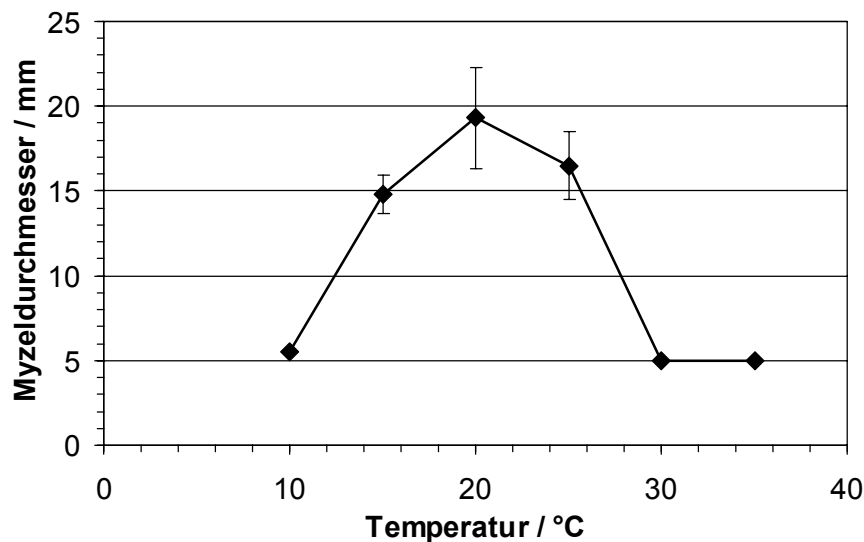


Abb. 5. 13 Temperaturoptimumkurve (Myzeldurchmesser nach 35 d, GNA, pH 6).

Hinsichtlich des pH-Wertes sind die Ansprüche des verwendeten *H. rhossiliensis*-Isolates wesentlich weiter gefaßt (Abb. 5. 14). Ab einem pH-Wert von 5,0 wird das Pilzwachstum von weiteren pH-Wert Steigerungen kaum beeinflusst, bei pH-Werten von mehr als 7,0 wächst das Myzel jedoch zunehmend dünner. Im sauren pH-

Bereich wächst das verwendete *H. rhossiliensis*-Isolat noch bei pH 3,0 und toleriert kurzzeitig sogar ein noch saureres Milieu ohne sofort abzusterben.

Entsprechend diesen Ergebnissen und den Erfahrungen anderer Autoren mit anderen *H. rhossiliensis*-Isolaten (s. 3. 7) wurde der Pilz in allen folgenden Versuchen bei 20 °C und pH 6,0 inkubiert.

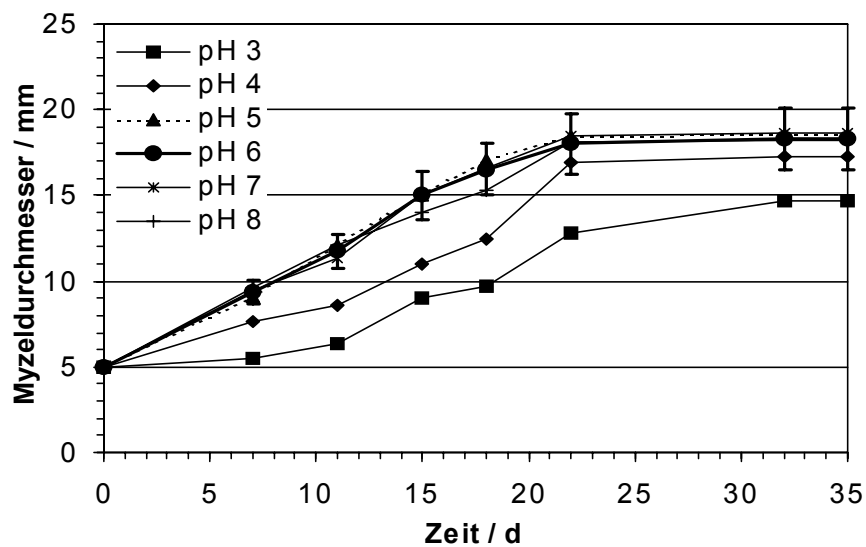


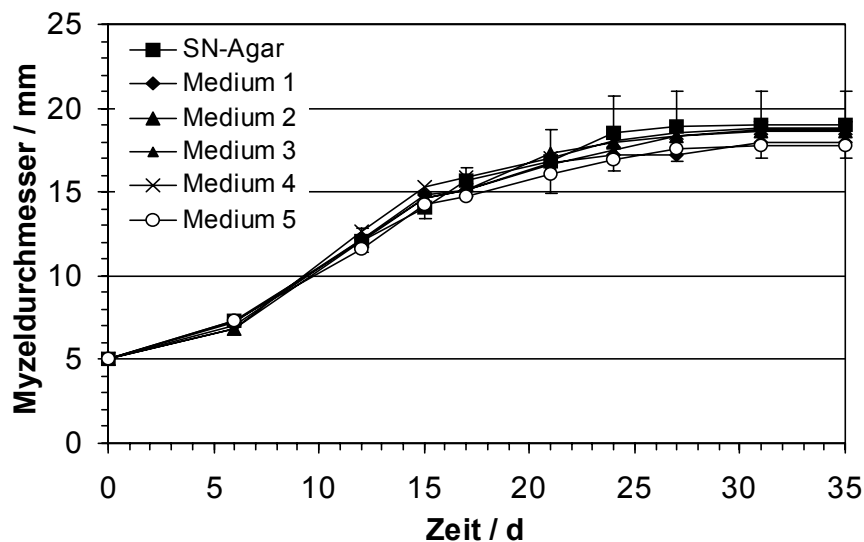
Abb. 5. 14 Wachstum bei verschiedenem pH (GNA, 20 °C).

### 5. 2. 2 Medienoptimierung

In Anlehnung an die ersten Anzuchtversuche mit der Gattung *Hirsutella* (McLoed 1959 a, 1959 b) wurden Auswachsversuche auf Agar mit verschiedenen Zusammensetzungen durchgeführt (Abb. 5. 15). Auf die Untersuchung anorganischer Stickstoffquellen als Mediumsbestandteil wurde verzichtet, da sie zur Anzucht ungeeignet sind (McLoed 1959 a).

Da in Gegenwart von Hefeextrakt die Zugabe von Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) und Kaliumchlorid (KCl) keinen positiven Einfluß auf das Pilzwachstum hatten, wurde bei allen späteren Versuchen auf eine Zugabe dieser Salze verzichtet.

Entgegen den Beobachtungen von McLoed (1959 b) kann bei dem hier verwendeten *H. rhossiliensis*-Isolat für ein schnelles Wachstum der Hefeextrakt weder ganz noch teilweise durch Glutamat ersetzt werden (Abb. 5. 16).



Medien- bestandteil	% (w/w)					
	GN-Agar	1	2	3	4	5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,10	-		0,10	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05	-		-	0,05	
KCl	0,05	-		-	-	0,05
Hefeextrakt	1,50	1,50	3,00	1,50	1,50	1,50
Agar-Agar	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Glucose	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Saccharose	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
deion. Wasser	94,80	95,00	93,50	94,90	94,95	94,95

Abb. 5. 15 Wachstum auf modifiziertem GN-Agar (pH 6, 20 °C).

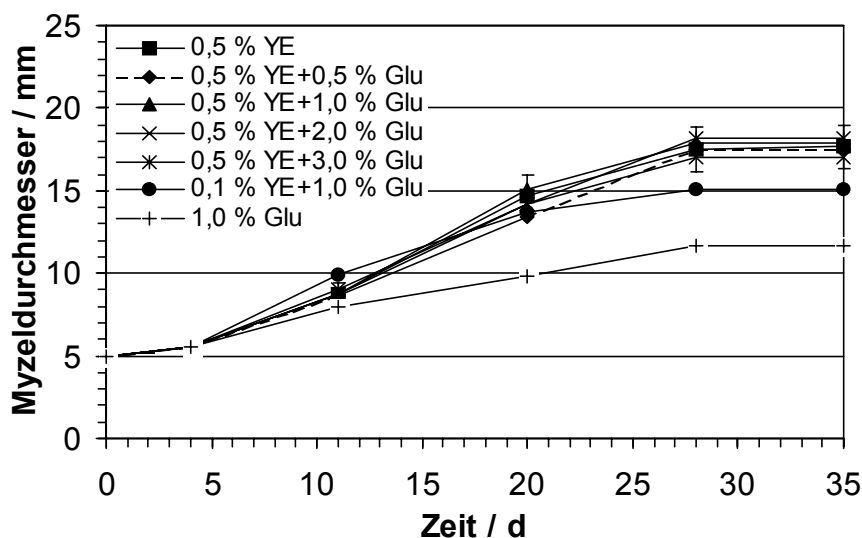


Abb. 5. 16 Einfluß von Glutamat (Glu) und Hefeextrakt (YE) auf das Wachstum (pH 6, 20 °C, 2 % (w/w) Glucose).

Im Zusammenhang mit den Auswuchsversuchen zur Medienoptimierung wurde auch untersucht, ob das in dieser Arbeit verwendete PDADMAC Nr. 1 (s. 4. 1. 2) in den zur Pilzverkapselung eingesetzten Konzentrationen einen negativen Einfluß auf das Wachstum von *H. rhossiliensis* hat, da es sich bei PDADMAC um eine zyklische quarternäre Ammoniumverbindung handelt und bekannt ist, daß viele quarternäre Ammoniumverbindungen eine antimikrobielle Wirkung besitzen und deshalb als Desinfektionsmittel eingesetzt werden (Wallhäußer 1995). Ein negativer Einfluß von PDADMAC Nr. 1 auf das Pilzwachstum konnte in den untersuchten Konzentrationen bis 3 % (w/w) jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 5. 17).

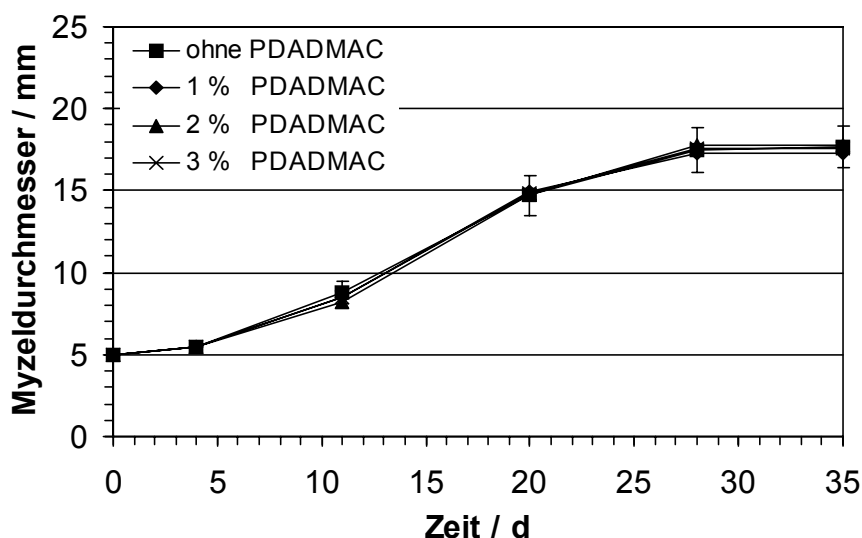
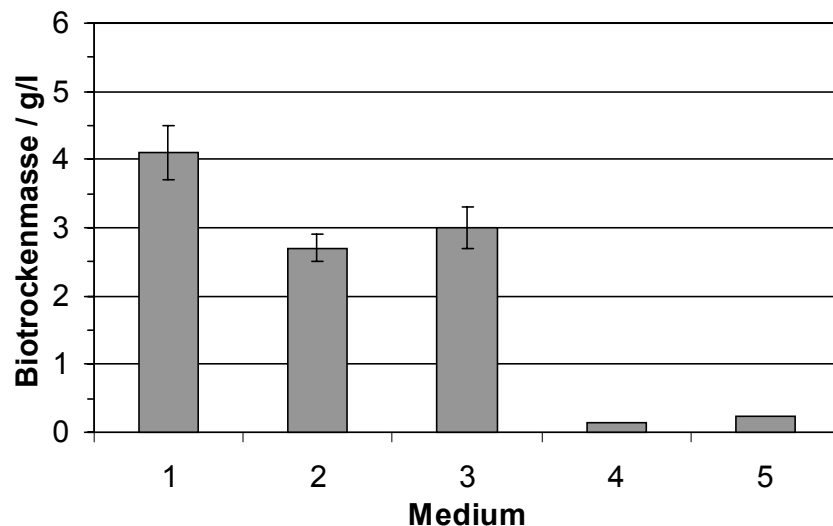


Abb. 5. 17 Einfluß von PDADMAC Nr. 1 auf das Wachstum (pH 6, 20 °C, 0,5 % (w/w) YE, 2 % (w/w) Glucose).

Aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Versuche und in Anlehnung an Patel (1998) wurde ein Flüssigmedium zur Anzucht von *H. rhossiliensis* im Schüttelkolben und im Fermenter entwickelt (Abb. 5. 18). Glucose scheint als Kohlenstoffquelle zur Anzucht von *H. rhossiliensis* besser geeignet zu sein als Saccharose (Medium 1 und 2). Eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 2 % (w/w) auf 3 % (w/w) verringerte die Ausbeute an Biomasse. Wurde ein Teil des Hefeextraktes durch Glutamat ersetzt, verringerte sich die Ausbeute (Medium 4 und 5) drastisch. Auch dies steht im Widerspruch zu McLoed (1959 b), der den Hefeextrakt teilweise durch Glutamat ersetzen konnte. Ein Medium aus Glutamat als Stickstoffquelle und der Zusatz einer Multivitaminmischung als Quelle für Vitamine, Provitamine und Spurenelemente ist für eine erfolgreiche Anzucht des Pilzes ebenfalls nicht geeignet (Medium 5).



Medien- bestandteil	% (w/w)				
	1	2	3	4	5
Multivitaminmischung	-	-	-	-	1
Hefeextrakt	0,5	0,5	0,5	0,2	-
Natrium-Glutamat	-	-	-	1	1
MES-NaOH-Puffer	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Glucose	2	-	3	-	-
Saccharose	-	2	-	-	-
deion. Wasser	96,7	96,7	95,7	96,0	95,2

Abb. 5. 18 Pilzausbeute bei Anzucht in verschiedenen Flüssigmedien (12 d, 120 UpM, 20 °C, pH 6).

Tab. 5. 1 zeigt die Zusammensetzung des optimierten Flüssigmediums, wie es zur Anzucht von *H. rhossiliensis* im Schüttelkolben verwendet wurde. Mit nur 1 % (w/w) Glucose und ohne MES-NaOH-Puffer, Penicillin und Streptomycin wurde es auch für Fermentationen eingesetzt (s. 5. 3).

Phosphatquellen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht gesondert untersucht. Da auf einen Zusatz von Phosphat jedoch nicht verzichtet werden sollte, enthält das Medium 0,1 % (w/w) di-Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ ).

Tab. 5. 1      Zusammensetzung des optimierten Flüssigmediums (pH 6,0).

Medienbestandteil	% (w/w)
Glucose	2,0
Hefeextrakt	0,5
MES-NaOH-Puffer	0,4
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,1
Penicillin	0,0025
Streptomycin	0,0025
deion. Wasser	96,595

Versuche, dieses Medium oder einzelne Bestandteile durch noch preiswertere technische Medien (Maismehl, Maisquellwasser, Bäckerhefe oder Kartoffelmehl; s. 4. 4. 2, Tab. 4. 9) zu ersetzen, waren nicht erfolgreich, da das feine Myzel des Pilzes in allen Fällen zwar angewachsen ist, sich bei der Ernte aber nicht vollständig von den zum Teil viskosen oder partikulären Medien trennen und quantifizieren ließ.

### 5. 2. 3 Anzucht im Schüttelkolben

Viele Pilze, darunter auch *H. rhossiliensis*, bilden Pellets während der Kultivierung in flüssigen Medien (Abb. 5. 19 und 5. 20). Die Pelletbildung ist hier jedoch unerwünscht, da das Myzel im Innern der Pellets aufgrund des mit zunehmender Schichtdicke immer größer werdenden Transportwiderstandes für Stoffwechselprodukte und Sauerstoff schlecht versorgt wird und an Vitalität einbüßt oder sogar ganz abstirbt. Auch eine Anreicherung in höheren Konzentrationen toxischer Stoffwechselprodukte kann hierzu zusätzlich beitragen.

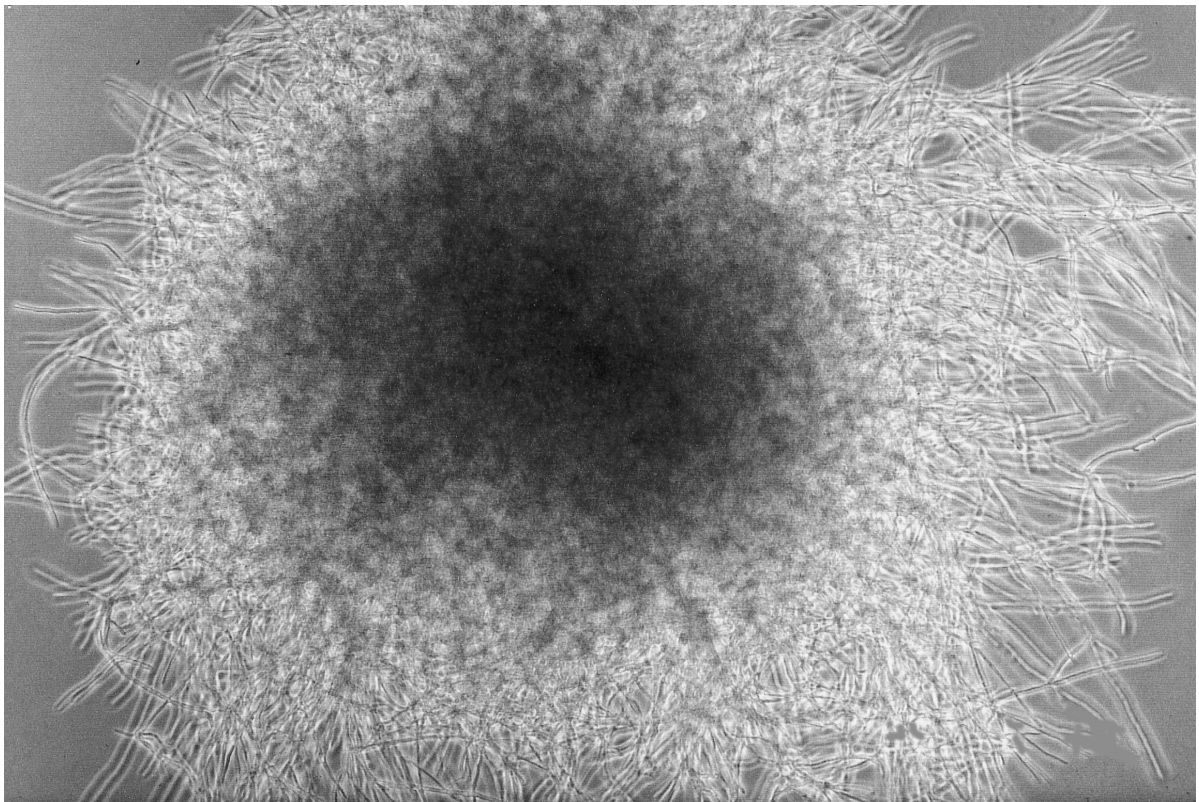


Abb. 5. 19 Pilzpellet nach acht Tagen Inkubation in einem Schüttelkolben ohne Schikanen (100 x).

Beim Auftreten von Pilzpellets sind im Prinzip zwei Fälle denkbar: Die Pellets können in Form von Vollkugeln auftreten und einen Kern aus inaktiver oder toter Biomasse besitzen oder es bilden sich Hohlkugeln durch Lysieren der inneren toten Zellen. Im Fall von *H. rhossiliensis* wurde der zweite Fall beobachtet (Abb. 5. 20 links). Bei langen Inkubationszeiten in wenig gerührten oder geschüttelten flüssigen Medien wurde ab einem Pelletdurchmesser von 1,7 mm die Bildung von Pilzhohlkugeln beobachtet, während kleinere Pellets Vollkugeln waren. Die Wanddicke der Hohlkugeln war annähernd konstant und betrug 0,5 mm bis 0,8 mm. Die Wand war in zwei Schichten mit unterschiedlicher Farbe unterteilt: Die innere, hellere Schicht der Hohlkugeln war etwas dünner als die äußere, dunkler gefärbte Schicht (Abb. 5. 20 links). Die Hohl-

kugeln waren im Innern mit Flüssigkeit gefüllt und recht stabil. Vereinzelt wurde das Auswachsen von neuem Pilzmyzel auf Basis der abgestorbenen und lysierten Zellen in den Pilzhohlkugeln beobachtet (Abb. 5. 20 rechts).

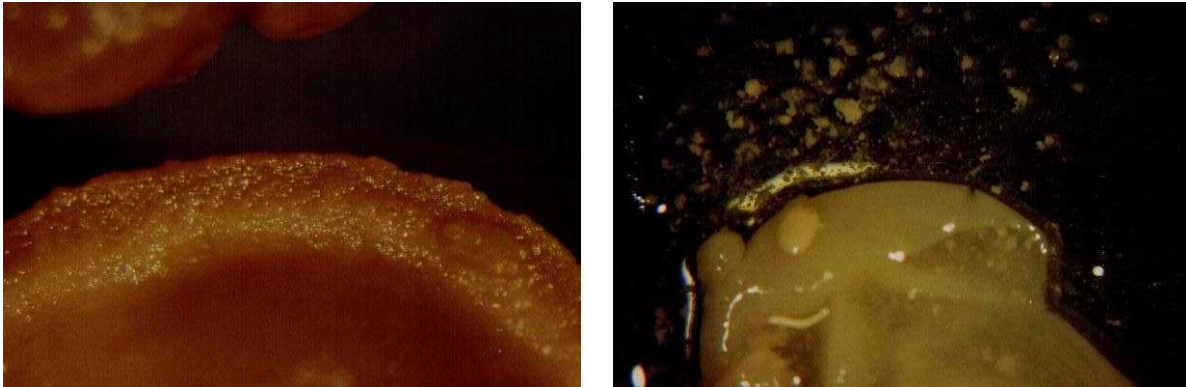


Abb. 5. 20 Bildung von Pilzhohlkugeln und Wachstum von neuen Pilzpellets im Innern dieser (aufgeschnittenen) Pilzhohlkugeln (links 40 x, rechts 10 x).

Die Anzucht von *H. rhossiliensis* für die Verkapselungsversuche und zum Animpfen der Fermentationen erfolgte in Schüttelkolben bei 20 °C in dem nach 4. 4. 3 optimierten Flüssigmedium (Tab. 5. 1). Um das anwachsende Pilzmyzel in den Schüttelkolben nicht durch zu hohe Scherkräfte zu schädigen, wurden die Kulturen bis zum vierten Tag bei 80 UpM geschüttelt und danach vier Tage bei 120 UpM (s. 4. 4. 4). Die Wahl der Schüttelkolben (mit oder ohne Schikanen) hat bei der Anzucht großen Einfluß auf die Beschaffenheit des Pilzmyzels, die entsprechend 4. 5. 4. 4 mittels Siebanalyse bestimmt und als Partikelgrößenverteilungsdichte- und Partikelgrößenverteilungssummenkurve dargestellt ist (Abb. 5. 21 und 5. 22).

Wird für die Anzucht ein Schüttelkolben ohne Schikanen verwendet, zeigt *H. rhossiliensis* ein pelletförmiges Wachstum (vgl. Abb. 5. 19). Der Myzelgrößenverteilung (Abb. 5. 21) ist zu entnehmen, daß weniger als 40 % des Pilzmyzels kleiner ist als 500 µm. Der größte Anteil wurde bereits auf einem Sieb mit 1000 µm Maschenweite zurückgehalten.



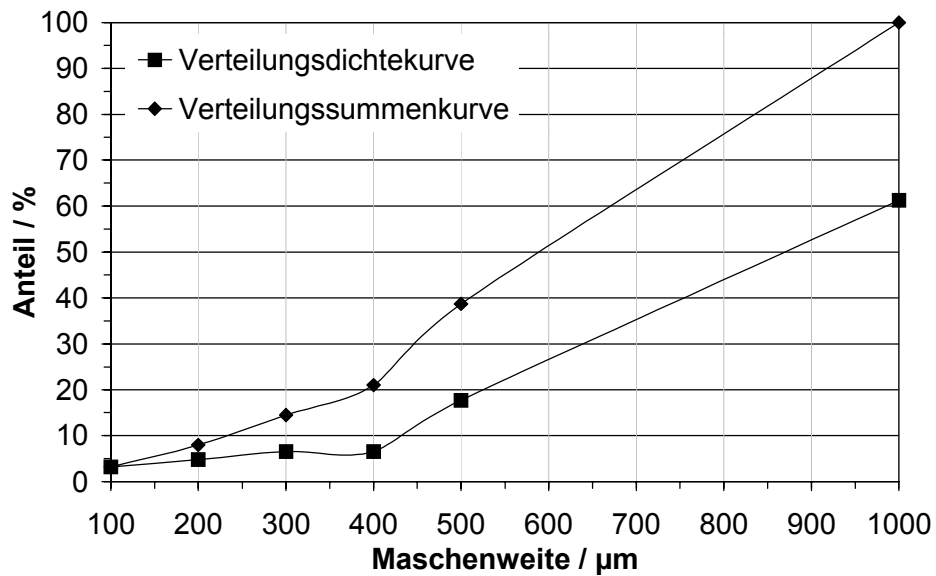


Abb. 5. 21 Myzelgrößenverteilung bei Anzucht in einem Kulturkolben ohne Schikanen (pelletförmiges Pilzmyzel).

Wenn dagegen zur Anzucht Kulturkolben mit Schikanen verwendet werden, bildet sich fein disperses Pilzmyzel (vgl. Abb. 5. 11). Etwa 95 % der gebildeten Biomasse sind kleiner als 500 µm. Die größte Fraktion liegt bei 300 µm und hat einen Anteil von etwa 45 % (Abb. 5. 22).

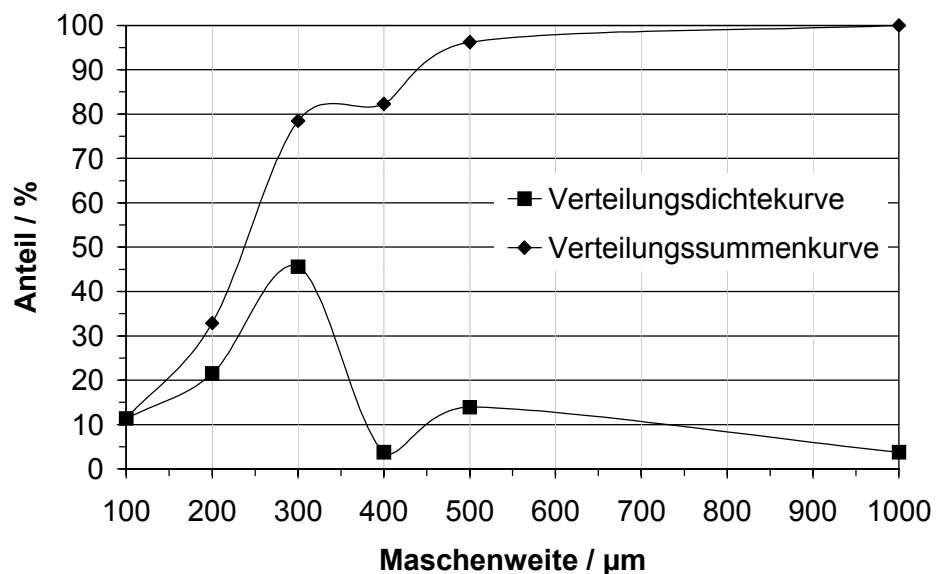


Abb. 5. 22 Myzelgrößenverteilung bei Anzucht in einem Kulturkolben mit drei Schikanen (fein disperses Pilzmyzel).

Die Ausbeute an Biotrockenmasse lag bei Anzucht in einem Kulturkolben mit drei Schikanen durchschnittlich bei  $4,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Das entspricht etwa  $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Biofeuchtmasse. Der Trockensubstanzgehalt der Biofeuchtmasse betrug durchschnittlich 8 %. Die

Glucose war mit etwa  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  zum Zeitpunkt der Ernte noch nicht vollständig verbraucht (Abb. 5. 23).

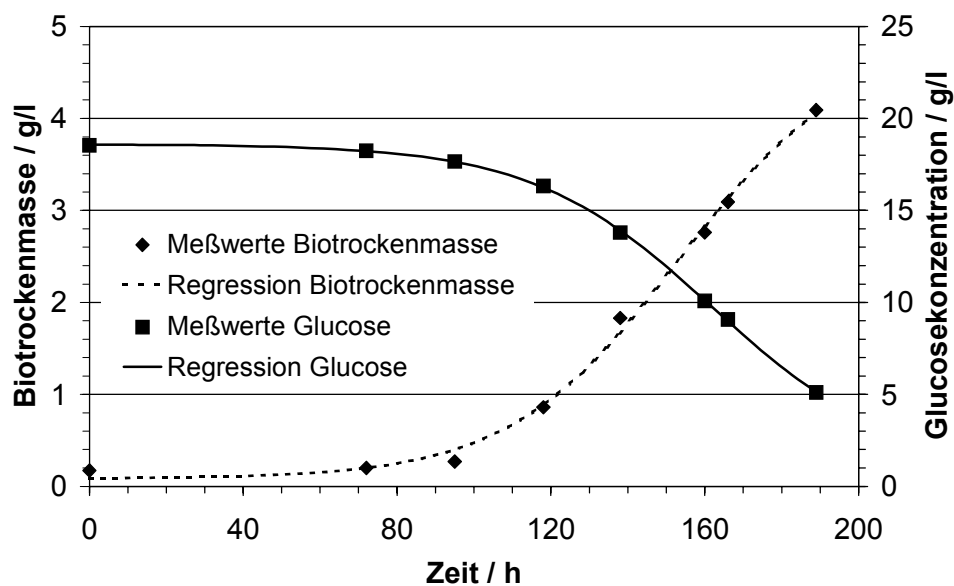


Abb. 5. 23 Anzucht von *H. rhossiliensis* in Schüttelkultur (Kolben mit drei Schikanten).

### 5. 3 Fermentation von *Hirsutella rhossiliensis*

Für einen großflächigen Einsatz von verkapseltem *H. rhossiliensis* zur biologischen Schädlingsbekämpfung ist eine Pilzanzucht in großem Maßstab erforderlich. Im Gegensatz zu vielen anderen nematophagen Pilzen, die als obligate Parasiten nur schwer oder garnicht auf künstlichen Medien vermehrt werden können (Mankau 1980 b; Jatala 1986; Wyss und Voß 1986; Dowe 1987; Kerry 1989, 1990 b; Stirling 1991; Kerry 1993; Kerry und Hominick 1999), ist *H. rhossiliensis* in Massen auf festen und in flüssigen Medien anziehbar (vgl. 3. 7, 5. 2 und 5. 3). Die Anzucht sollte vorzugsweise im Fermenter durchgeführt werden. Dabei soll der Pilz nach der Fermentation möglichst vital sein, um später schnell aus den Kapseln auswachsen zu können. Die Verkapselung von möglichst fein disperser, pilzlicher Biomasse ermöglicht das Auswachsen vieler einzelner keimfähiger Myzelstückchen aus den Kapseln. Fein verteilter Pilz in den Kapseln ist bei gleicher Biomassemenge daher wesentlich effektiver als wenige grobe Pilzpellets. Feines Pilzmyzel erleichtert dabei nicht nur die Herstellung der Pilzkapseln, sondern ermöglicht natürlich auch die Produktion möglichst kleiner Kapseln, die dann ihrerseits effektiv im Boden verteilt werden können.

Die Unterdrückung der unerwünschten Pelletbildung bei der Fermentation kann z. B. durch konstruktive Merkmale des Fermenters (z. B. Geometrie, Schlaufenreaktor, Rührer), erhöhten Energieeintrag (z. B. höhere Rührerdrehzahl, Begasungsrate) oder durch Zusatzstoffe erreicht werden (Irvine 1990; Kleespies *et al.* 1998). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß insbesondere die Beschaffenheit des Inokulums großen Einfluß auf das Pilzwachstum während der Fermentation hat (s. 5. 3. 2).

#### 5. 3. 1 Bestimmung der spezifischen Glucoseaufnahme- und der Wachstumsrate

Für die mathematische Beschreibung des Wachstums von *H. rhossiliensis* und die Bestimmung wichtiger Wachstumsparameter wurde das Wachstumsmodell von Monod zugrunde gelegt (s. 4. 5. 3).

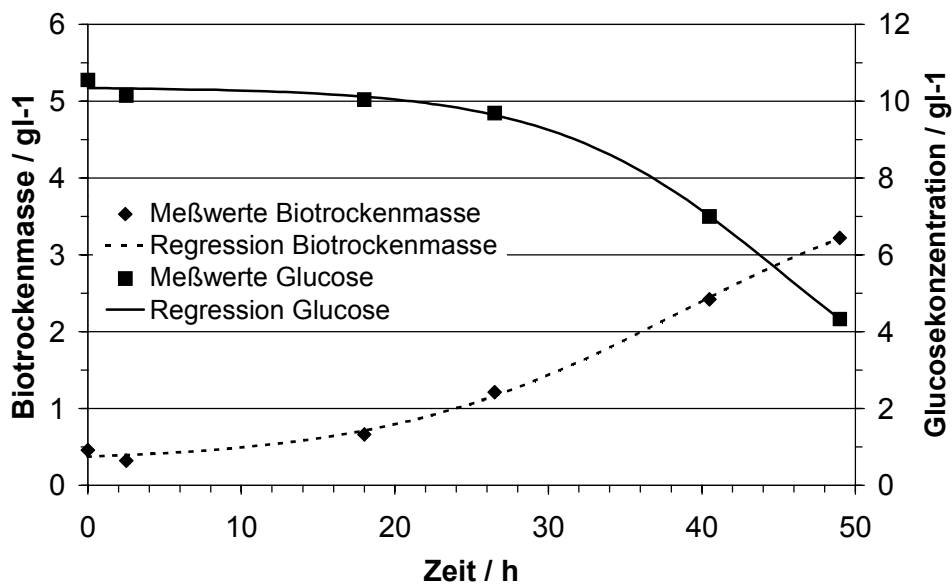


Abb. 5. 24 Zunahme der Biotrockenmasse und Abnahme der Glucosekonzentration im Verlauf der Fermentation.

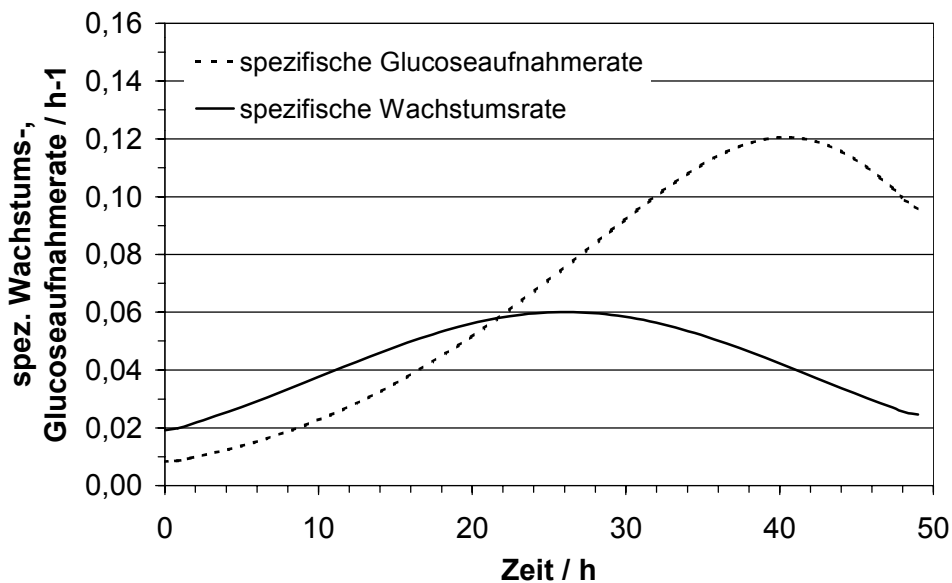


Abb. 5. 25 Verlauf der spezifischen Wachstums- und Glucoseaufnahme rate während der Fermentation.

Die Untersuchungen wurden in einem 5 l-Fermenter mit länglicher Geometrie durchgeführt (s. 4. 5. 1, Tab. 4. 6). Grundlage der Berechnungen der Wachstumsparameter sind die Verläufe von Biotrockenmasse, Glucosekonzentration, spezifischer Wachstums- und Glucoseaufnahme rate (Abb. 5. 24 und 5. 25).

Tab. 5. 2 gibt einen Überblick über die Einstellungen während der Fermentation sowie über die entsprechend 4. 5. 3 bestimmten Wachstumsparameter.

Tab. 5. 2 Fermentationen zur Bestimmung wichtiger Wachstumsparameter

	5 l-Fermenter
<b>Einstellungen:</b>	
Rührerdrehzahl / UpM	100
Begasungsrate / V/VM <sup>1)</sup>	1,6
Begasungsrate / l/min	8,0
Temperatur / °C	20,0
<b>Wachstumsparameter:</b>	
Biotrockenmasse (nach etwa 50 h) / g·l <sup>-1</sup>	3,2
Max. spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ / h <sup>-1</sup>	0,06
Min. Verdopplungszeit $t_d$ / h	11,5
Durchschnittliche Verdopplungszeit $t_d$ / h	15,9
Max. spezifische Substrataufnahmerate / h <sup>-1</sup>	0,121
Ertragskoeffizient (nach etwa 50 h)	0,44

<sup>1)</sup> Volumenstrom der Zuluft in l/min bezogen auf das Arbeitsvolumen in l

Während einer Fermentationsdauer von 50 Stunden wurden insgesamt 16 g Biofeucht- bzw. 3,2 g·l<sup>-1</sup> Biotrockenmasse gebildet. Die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  konnte mit 0,06 h<sup>-1</sup> bestimmt werden (s. 4. 5. 3, Gl. 4. 4). Erst 15 h nach Erreichen der maximalen spezifischen Wachstumsrate wurde auch die maximale Glucoseaufnahmerate (s. 4. 5. 3, Gl. 4. 7; Abb. 5. 25) erreicht. Möglicherweise kann bei geringen spezifischen Wachstumsraten die erforderliche Energie auch aus dem Hefeextrakt gewonnen werden, so daß Glucose erst nach Verbrauch der entsprechenden Komponenten des Hefeextrakts in zunehmendem Maße aufgenommen wird (s. u.).

Die Verdopplungszeit, d. h. die Zeit, in der sich die Zellmasse des Pilzes verdoppelt (s. 4. 5. 3, Gl. 4. 5), liegt durchschnittlich bei 15,9 h und fällt nach etwa 26 h auf 11,5 h ab. Der als Quotient des Ertrages (s. 4. 5. 3, Gl. 4. 9) und der Substrataufnahme definierte Ertragskoeffizient (s. 4. 5. 3, Gl. 4. 10) liegt bei 44 %. Der Ertragskoeffizient muß allerdings mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden, da bei seiner Berechnung nur Glucose als Substrat berücksichtigt wurde. Neben Glucose, die im Fermentationsmedium in einer Konzentration von 1 % enthalten ist, wurde auch Hefeextrakt in einer Konzentration von 0,5 % zugesetzt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Zuckers und von Hefeextrakt ergibt sich eine Trennung zwischen Energie- und Kohlenstoffquelle (Dellweg 1987). Hefeextrakt beinhaltet alle wesentlichen Bausteine von Hefezellen. Da Hefen und Pilze eng verwandt sind, einen ähnlichen Stoffwechsel besitzen und auch ähnliche Nährstoffe verwerten, wird der Pilz zur Bildung neuer Biomasse anfangs vermutlich fast ausschließlich Hefeextrakt verwenden. Glucose dient in diesem Fall lediglich der oxidativen Energiegewinnung. Erst wenn die entsprechenden Anteile aus dem Hefeextrakt aufgebraucht sind, werden auch aus Glucose neue Zellbausteine aufgebaut. Dies könnte auch erklären, warum

die spezifische Glucoseaufnahme rate der spezifischen Wachstumsrate hinterherläuft (s. o.). Will man also den zeitlichen Verlauf des Ertragskoeffizienten bestimmen, so ergibt sich am Anfang der Fermentation das Problem, daß ein großer Teil des aufgenommenen Substrats sich zwar in der Bildung von Biotrockenmasse (Zähler), nicht aber in der Aufnahme von Substrat (Nenner) niederschlägt, so daß Ertragskoeffizienten von mehr als 100 % erhalten werden, die keine sinnvolle Aussage über das Wachstum des Pilzes zulassen.

Um zu überprüfen, ob das Wachstumsmodell nach Monod hier auf das Wachstum des filamentösen Pilzes *H. rhossiliensis* übertragen werden darf, wurde zur Kontrolle mit den berechneten Wachstumsraten und Verdopplungszeiten nach Dellweg (1987) die am Ende der Fermentation zu erwartenden Biotrockenmassen berechnet (s. 4. 5. 3, Gl. 4. 11) und mit den tatsächlichen Werten verglichen. Danach wird eine Biotrockenmassekonzentration von  $3,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  erwartet. Die gemessenen Biotrockenmassekonzentration liegt bei  $3,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Der kleine Unterschied zwischen der erwarteten und den gemessenen Biotrockenmassekonzentration beruht wahrscheinlich zum Teil auf dem Problem, daß im Verlauf der Entnahme, der Aufbereitung, der Analytik und der Auswertung der Proben die Abweichung vom wahren Wert zunimmt. Da die Werte aber dennoch eine recht gute Übereinstimmung zeigen, kann angenommen werden, daß das herangezogene Berechnungsmodell mit ausreichender Genauigkeit auch auf das Wachstum des filamentösen Pilzes *H. rhossiliensis* anwendbar ist.

### 5. 3. 2 Herstellung von fein dispersem Pilzmyzel

Ziel war die fermentative Herstellung fein disperser Biomasse von *H. rhossiliensis*, die insbesondere zur Verkapselung und für die Wirkung beim Einsatz in der biologischen Nematodenbekämpfung besonders vorteilhaft ist (s. 5. 3). Dazu wurde jeweils entsprechend 4. 5. 4. 4 mit Siebanalysen die Partikelgrößenverteilung der angezogenen Biomasse bestimmt und als Partikelgrößenverteilungsdichte- und Partikelgrößenverteilungssummenkurve dargestellt.

Es hat sich gezeigt, daß bereits die Beschaffenheit des Pilzmyzels der zum Animpfen des Fermenters verwendeten Vorkultur die Größe des Myzels bei der Fermentation beeinflusst.

Wird eine Vorkultur mit grobem, pelletförmig gewachsenen Pilzmyzel (Abb. 5. 21) zum Animpfen einer Fermentation verwendet, bildet der Pilz auch im Fermenter pelletförmiges Myzel (Abb. 5. 26). Nach der Fermentation waren im Vergleich mit der Vorkultur sogar nur noch weniger als 25 % des Pilzmyzels kleiner als  $500 \mu\text{m}$ .

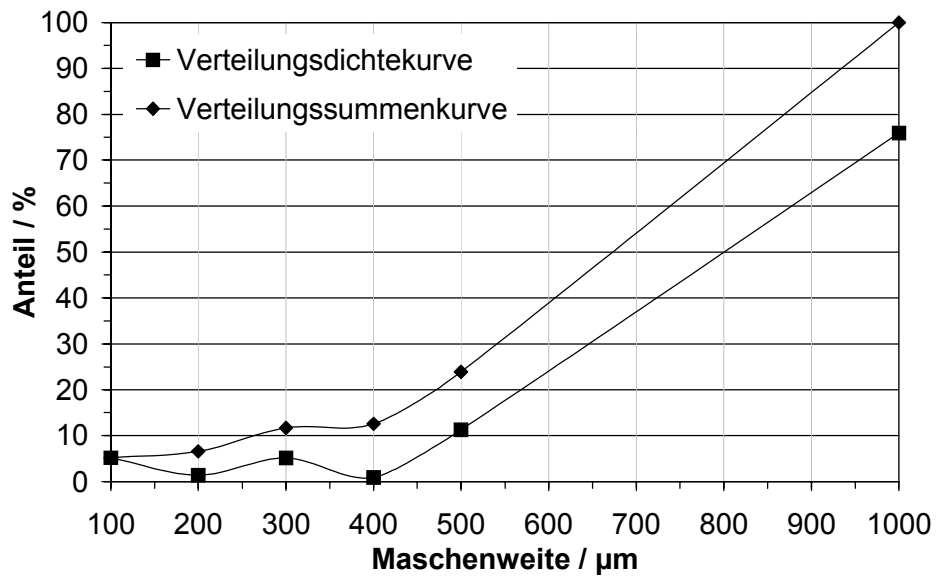


Abb. 5. 26 Myzelgrößenverteilung nach einer Fermentation bei 100 UpM und 0,4 V/VM unter Verwendung eines pelletförmigen Inokulums.

Bei Verwendung von fein disperser Biomasse als Inokulum (Abb. 5. 22) wächst auch im Fermenter feines Pilzmyzel heran (Abb. 5. 27).

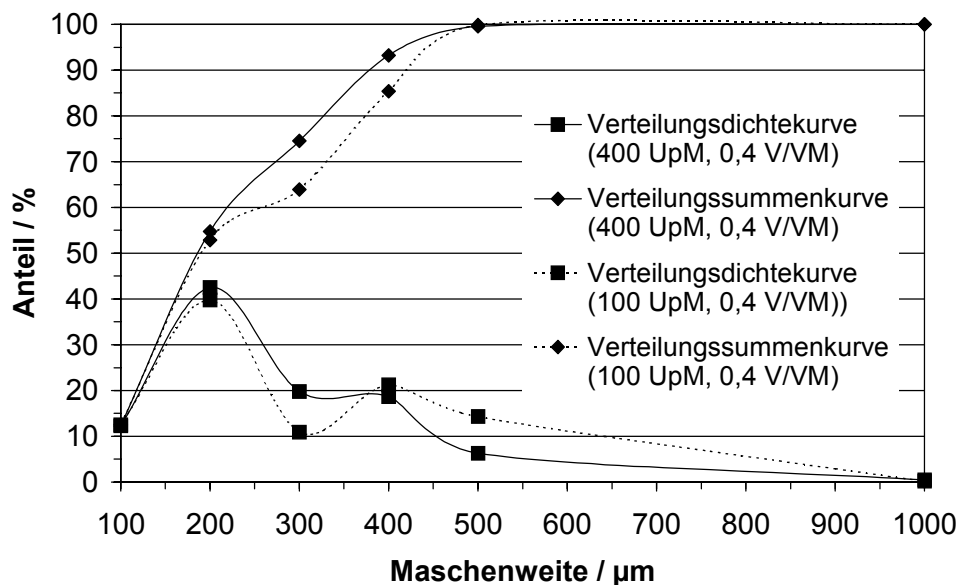


Abb. 5. 27 Verteilungsdichte- und Verteilungssummenkurven bei unterschiedlich hohem Leistungseintrag durch Rühren.

Dabei spielt der Leistungseintrag in den Fermenter durch verschiedene Rührerdrehzahlen (100 und 400 UpM) kaum eine Rolle. Die Unterschiede zwischen den Partikelgrößenverteilungen beider Fermentationen sind sehr gering. Die Hauptfraktion lag jeweils im Partikelgrößenintervall zwischen 200 und 300  $\mu\text{m}$ . Bei geringem Leistungseintrag enthielt sie 40 %, bei hohem Leistungseintrag 42 % der Trockenmasse. Unter 500  $\mu\text{m}$  lagen bei schwachem Rühren 85 %, bei starkem Rühren 93 %

der Trockenmasse. Das unerwünschte Wachstum von Pellets wird also auch bei nur 100 UpM erfolgreich unterdrückt.

Die Bestimmung wichtiger Wachstumsparameter zeigte keine großen Unterschiede zwischen den beiden Fermentationen (Tab. 5. 3).

Tab. 5. 3 Vergleich des Pilzwachstums bei unterschiedlich hohem Leistungseintrag durch Rühren

	Hoher Leistungseintrag (400 UpM)	Geringer Leistungseintrag (100 UpM)
<b>Einstellungen:</b>		
Rührerdrehzahl / UpM	400	100
Begasungsrate / V/VM	0,4	0,4
Begasungsrate / l/min	2,0	2,0
Temperatur / °C	20,0	20,0
<b>Ergebnisse:</b>		
Biotrockenmasse (nach etwa 50 h) / g·l <sup>-1</sup>	5,0	3,7
Max. spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ / h <sup>-1</sup>	0,066	0,057
Min. Verdopplungszeit $t_d$ / h	10,5	12,1
Durchschnittliche Verdopplungszeit $t_d$ / h	16,9	20,0
Max. spezifische Substrataufnahmerate / h <sup>-1</sup>	0,075	0,070
Ertragskoeffizient (nach etwa 50 h)	0,57	(0,99)

Die Verdopplung der Pilzmasse nahm bei 100 UpM durchschnittlich 20,0 h in Anspruch, etwa 3 h mehr als bei 400 UpM. Auch die minimale Verdopplungszeit innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase lag mit einem Wert von 12,1 h etwa 1,6 h über dem Wert, der sich bei 400 UpM einstellte, und wurde nach rund 35 h erreicht. Aufgrund dieser Wachstumsverzögerung bildeten sich bei 100 UpM nur 3,7 g·l<sup>-1</sup> Biotrockenmasse. Dagegen wurden bei 400 UpM 5,0 g·l<sup>-1</sup> Biotrockenmasse erhalten. Bei der Berechnung von Ertragskoeffizienten ist bereits auf Probleme hingewiesen worden (s. o.), die auch hier wieder deutlich werden. Bei geringem Leistungseintrag ergibt sich rechnerisch ein Ertragskoeffizient von 0,99. Es ist jedoch nicht möglich, daß 99 % des aufgenommenen Substrats der Bildung von Biomasse und nur 1 % der Bereitstellung von Energie dienen. Die Zunahme an Biotrockenmasse muß auf der verstärkten Aufnahme von Hefeextrakt am Anfang der Fermentation beruhen, die aber schwer zu bestimmen ist.

Die Herstellung fein disperser Biomasse von *H. rhossiliensis* kann im Fermenter erfolgen, wenn zum Animpfen bereits feines Pilzmyzel verwendet wird. Der Leistungseintrag durch den Rührer in den Fermenter hat kaum einen Einfluß auf die Partikelgrößenverteilung. Bei einer höheren Drehzahl wird jedoch eine größere Pilzausbeute erzielt.



#### 5. 4 Optimierung von Auswachsen und Sporulation des Pilzes aus den Kapseln

Da der Einsatz freier Organismen zur biologischen Nematodenbekämpfung in der Regel nicht erfolgreich ist (Stirling 1991, Siddiqui und Mahmood 1996; Patel 1998), erfolgt in dieser Arbeit der Einschluß des Nützlings *Hirsutella rhossiliensis* in Kapseln.

Im Gegensatz zu allen anderen Formulierungsversuchen in Alginat, bei denen nur *H. rhossiliensis* verkapselt wurde (Lackey *et al.* 1993; Jaffee *et al.* 1995; Jaffee und Muldoon 1995; Tedford *et al.* 1995; Robinson und Jaffee 1996; Jaffee und Muldoon 1997; Jaffee 1999, 2000) erfolgte hier der Einschluß des Pilzes zusammen mit Nährstoffen in Hohlkugeln auf Basis von SEC und PDADMAC, die größere Vorteile erwarten lassen (Patel 1998). Im flüssigen Kern der Hohlkugeln kann der Pilz in Gegenwart der Nährstoffe wie in einer Art „Minifermenter“ schnell anwachsen, vergleichbar auch mit dem Wachstum der Pilzhypen im Körper eines infizierten Nematoden (vgl. 3. 7). *H. rhossiliensis* wächst aus den Kapseln aus, verbreitet sich im Boden und bildet an den Spitzen der Phialiden die Sporen, die die Nematoden abtöten.

Ferner bringt die klassische Formulierung in Alginat gerade bei einem massenweisen Einsatz in der biologischen Schädlingsbekämpfung aufgrund des hohen Preises (Fravel *et al.* 1998), der Förderung des Wachstums unerwünschter Mikroorganismen (Lohmann 1989; Cassidy *et al.* 1996) und einer eventuell auftretenden Beeinträchtigung des Wurzelwachstums (Lohmann 1989; Schuster und Sikora 1992) Nachteile mit sich.

Neben dem Schutz und der kontrollierten Freisetzung des nematophagen Pilzes soll die Formulierung auch die Lagerung und die einfache Ausbringung der Organismen ermöglichen (Stirling 1988 a, 1991; Stirling und Mani 1995). Für die hier hergestellten SEC/PDADMAC-Kapseln ist eine Ausbringung im Boden um den Zuckerrübensamen herum geplant, die sich z. B. mit in der landwirtschaftlichen Praxis bereits vorhandenen Maschinen realisieren läßt. Diese Maschinen werden normalerweise dazu verwendet, während der Aussat gleichzeitig in Kapseln formulierten Dünger in der Umgebung des Samens in den Boden einzuarbeiten (z. B. Nokka-Tume OY 1999).

Das Auswachsverhalten von *H. rhossiliensis* aus den Kapseln wurde durch Auslegen der verschiedenen hergestellten Kapseln auf Wasseragar bei pH 6,0 untersucht (vgl. Abb. 5. 29 und Abb. 5. 30). Die Petrischalen wurden bei 20 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 75 % inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurde mit einer Stereolupe der Durchmesser des kreisförmig auswachsenden Myzels gemessen. Ausgemessen wurden je Variation mindestens 20 Kapseln. Die Standard-Abweichung wurde jeweils nur für eine Kapselsorte angegeben, für die anderen Kapseln war sie jeweils ähnlich. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 35 Tage. Eine Ausweitung dieses Zeitraums wurde nicht vorgenommen, denn bei der Bekämpfung des

Zuckerrüben nematoden *Heterodera schachtii* sind nur die ersten zwei bis drei Wochen von Bedeutung, in denen die Zuckerrübenkeimlinge eines besonderen Schutzes bedürfen. In dieser Zeit muß der Pilz aus der Kapsel schnell auswachsen und sich im Boden etablieren.

Die Optimierung der SEC/PDADMAC-Kapseln findet sich unter 5. 4. 1, ein Vergleich mit anderen Kapselsystemen, u. a. Calciumalginatvollkugeln, unter 5. 4. 2.

#### **5. 4. 1      Kapseln aus SEC und PDADMAC**

Zur Herstellung der SEC/PDADMAC-Kapseln wurde *H. rhossiliensis* entsprechend 4. 4 bzw. 5. 2. 3 im Schüttelkolben angezogen und, wie unter 4. 6. 1. 1 angegeben, in Hohlkugeln aus SEC und PDADMAC Nr. 1 verkapselt.

##### **5. 4. 1. 1      Biomassegehalt**

Um den angezogenen bzw. fermentierten Pilz effektiv nutzen zu können, sollte der Biomassegehalt der Kapseln möglichst gering sein. Eine Variation des Biofeuchtegehaltes zwischen 15 und 0,1 % (w/w) zeigt, daß sich kaum Auswirkungen auf das Auswachsverhalten aus den Kapseln ergeben (Abb. 5. 28 und Abb. 5. 29). Lediglich die Kapseln mit nur 0,1 % (w/w) Biomasse zeigen ein geringfügig schlechteres Auswachsverhalten (Abb. 5. 28). Das Pilzwachstum aus den Kapseln mit geringer Biomassebeladung ist hier sogar noch besser als in einem ähnlichen Versuch von Patel (1998).

Geringe Biomassebeladungen machen es möglich, bei der Verkapselung die Kulturbrühe der Pilzernte aus der Anzucht in Flüssigkultur ohne weitere Aufarbeitung direkt einzusetzen. Kapseln, die in einem Versuch auf diese Weise hergestellt wurden, standen denen mit geernteter und aufbereiteter Biomasse hinsichtlich des Auswachsverhaltens in nichts nach.

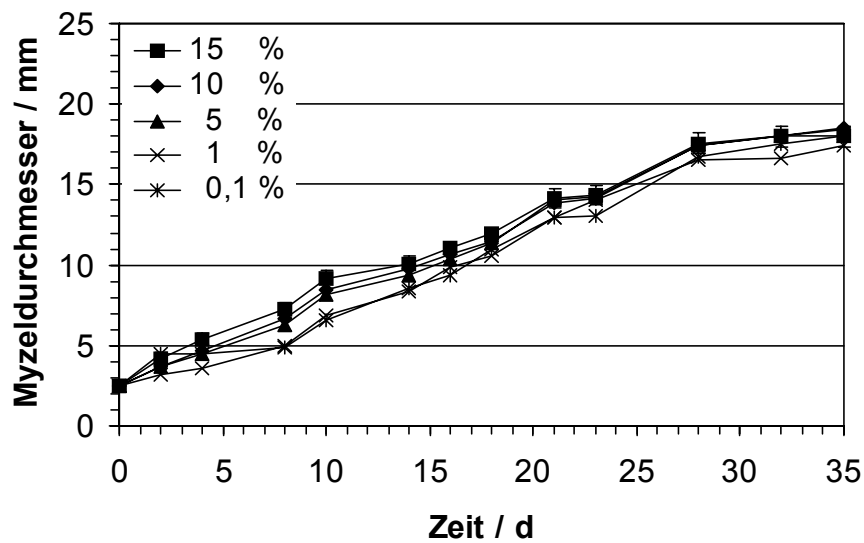


Abb. 5. 28 Auswachsen aus Kapseln mit unterschiedlicher Biomassebeladung (Kapselmedium: 15 % Maiskleber und 0,5 % Hefeextrakt).

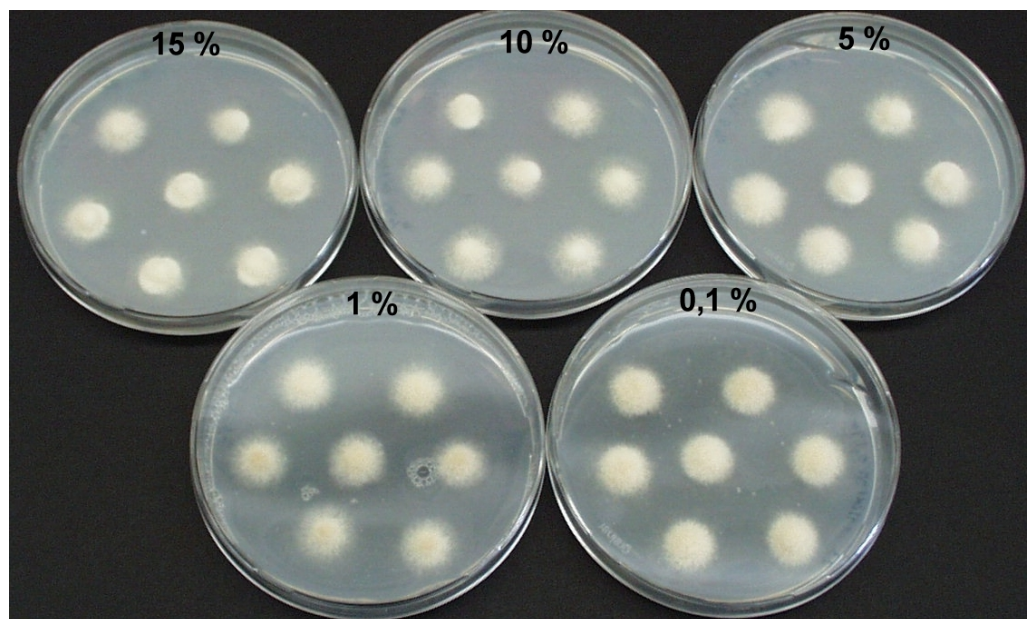


Abb. 5. 29 Auswachsene Kapseln mit unterschiedlicher Biomassebeladung nach 35 d (Kapselmedium: 15 % Maiskleber und 0,5 % Hefeextrakt).

#### 5. 4. 1. 2 Wachstumsmedium

Da der Schutz der Wurzeln der jungen Zuckerrübenpflänzchen vor einem Befall mit den Larven des Nematoden *Heterodera schachtii* gerade in den ersten zwei bis drei Wochen nach der Aussaat besonders wichtig ist (s. 3. 4), muß der Pilz möglichst schnell und möglichst weit aus den Kapseln auswachsen. Da *H. rhossiliensis* nur

über geringe saprophytische Eigenschaften verfügt (Sturhan und Schneider 1980; s. 3. 7), ist das mitverkapselte Medium für ein schnelles und möglichst weitreichendes Wachstum des Myzels von entscheidender Bedeutung (Abb. 5. 30). Patel (1998) verwendete u. a. den bei der Maisstärkegewinnung als Abfallprodukt anfallenden und als Viehfutter eingesetzten Maiskleber (Concentra<sup>®</sup> 13883, Cerestar Deutschland GmbH, Krefeld) und Hefeextrakt als Kapselmedium. Ausgehend von diesem Medium (15 % (w/w) Maiskleber und 0,5 % (w/w) Hefeextrakt) wurden die folgenden Optimierungen durchgeführt.

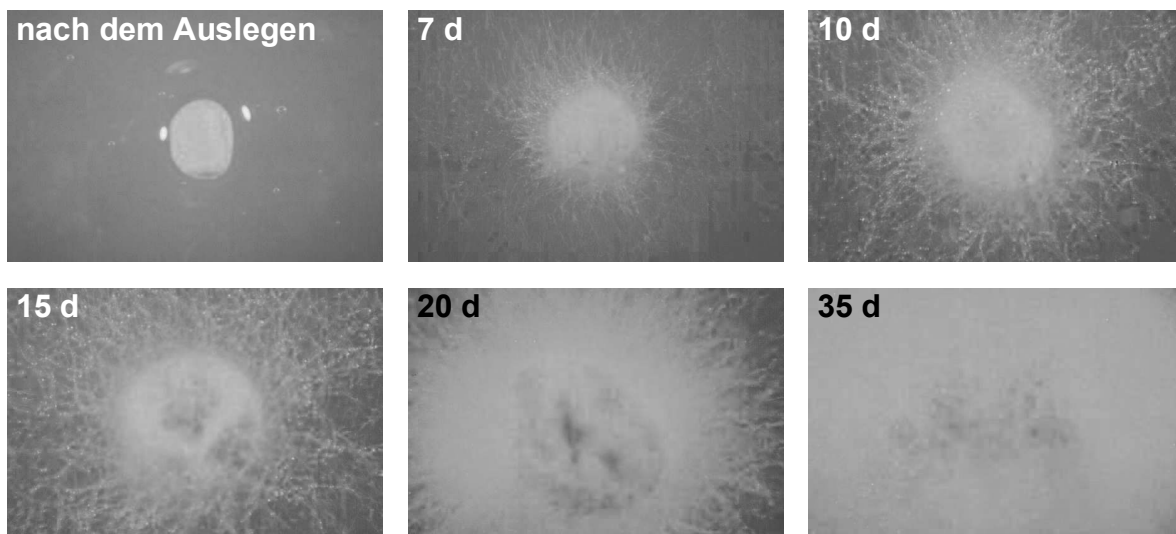


Abb. 5. 30 Auswachsen aus Kapseln mit 15 % BFM, 15 % Maiskleber und 0,5 % Hefeextrakt.

Der Versuch, dem Abb. 5. 31 zugrunde liegt, zeigt, daß eine Absenkung der Maisklebermenge von 15 % auf 5 % und eine Absenkung der Hefeextrakt-Konzentration von 0,5 % auf 0,2 % kaum einen Einfluß auf das Auswachsen von *Hirsutella rhossiliensis* aus den Kapseln haben. Fehlt der Hefeextrakt ganz, wachsen die Kapseln gerade in den interessanten ersten 15 Tagen etwas langsamer aus.

In einem weiteren Versuch wurde das Auswachsverhalten bei noch geringeren Maiskleber und Hefeextraktgehalten untersucht (Abb. 5. 32). Zum Vergleich mit dem ersten Experiment (Abb. 5. 31) wurden nochmals Kapseln mit 15 % Maiskleber und 0,5 % Hefeextrakt hergestellt.

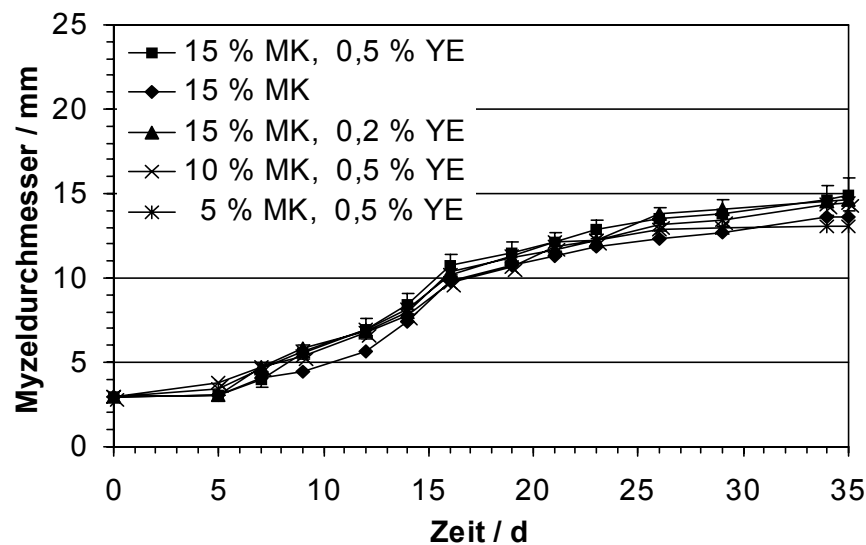


Abb. 5. 31 Auswachsen aus Kapseln mit unterschiedlichem Maiskleber- (MK) und Hefeextraktgehalt (YE) I (15 % Biofeuchtmasse).

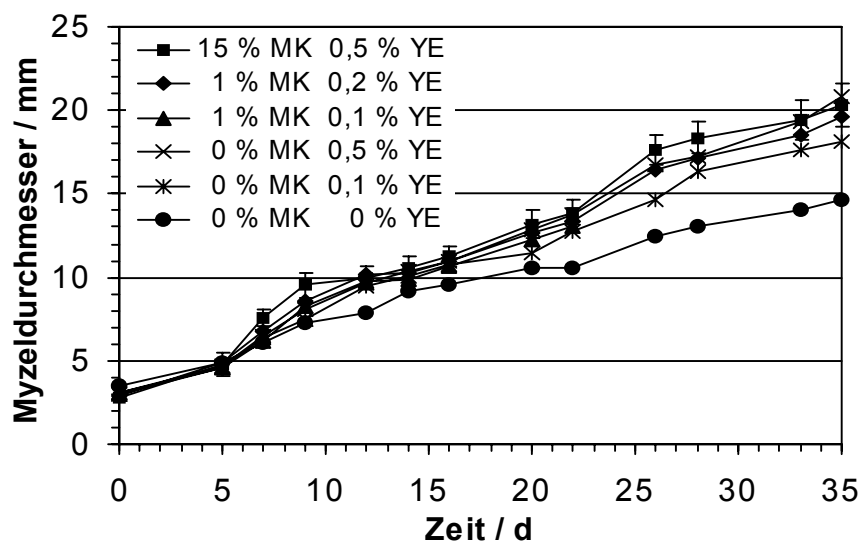


Abb. 5. 32 Auswachsen aus Kapseln mit unterschiedlichem Maiskleber- (MK) und Hefeextraktgehalt (YE) II (15 % Biofeuchtmasse).

Dieser Versuch zeigt, daß der Maiskleber nur einen geringen Einfluß auf das Auswachsverhalten hat. Kapseln mit nur 1 % Maiskleber und 0,1 % Hefeextrakt bzw. solche ohne Maiskleber und mit 0,5 % Hefeextrakt zeigen ein ähnliches Auswachsverhalten wie die Kapseln, die 15 % Maiskleber und 0,5 % Hefeextrakt enthalten. Allerdings zeigte dieser Versuch auch, daß die Bewertung des Auswachsverhaltens aufgrund des mit der Stereolupe gemessenen Myzeldurchmessers nicht alle Faktoren berücksichtigt. So wird z. B. die Dichte des ausgewachsenen Myzels nicht berücksichtigt. Gerade aber die Myzeldichte unterscheidet sich in diesem Versuch erheblich. Bei großen Hefeextraktkonzentrationen ist das Myzel wesentlich dichter als bei geringeren Konzentrationen. Der Einfluß dieses Parameters kann nur durch Be-

stimmung der Anzahl der gebildeten Sporen (vgl. 5. 4. 1. 3) oder besser noch im Rahmen von Wirksamkeitsuntersuchungen geklärt werden.

Da es im Zusammenhang mit den Pathogenitätsuntersuchungen der Kapseln mit Maiskleber und Hefeextrakt zu einer starken Beeinträchtigung des Wurzelwachstums der Zuckerrübenpflänzchen aufgrund des mikrobiologischen Abbaus dieser Materialien gekommen ist, (s. 5. 5; Gutberlet 2000), mußten Alternativen zu diesem Kapselmedium gefunden werden. Ferner kommt zu dem hohen Preis des Hefeextrakts bei massenweisem Einsatz als weiterer Nachteil noch hinzu, daß bei einer Anwendung der Kapseln mit Maiskleber und Hefeextrakt die Menge des in den Ackerboden eingetragenen Stickstoffs sehr hoch wäre, was die Qualität der Zuckerrüben mindern könnte (Geisler 1983; Bornscheuer 1986).

Es ist bekannt, daß z. B. gerade die niedermolekularen Inhaltsstoffe des Hefeextrakts durch die Kapselmembran hindurch nach außen diffundieren können (Patel 1998). Diese Tatsache wurde auch bei der Herstellung der Pilzkapseln (s. 4. 6. 1. 1 und 4. 6. 2) in der Form berücksichtigt, daß die Kapseln nach der Herstellung immer mit Wasser unter Zusatz der gleichen Hefeextraktkonzentration wie in den Kapseln gewaschen und bei Bedarf auch in solchen Lösungen gelagert werden mußten. Als Alternative zum Kapselmedium aus Maiskleber und Hefeextrakt sind daher ausschließlich höhermolekulare Medienbestandteile einsetzbar, die nur langsam oder garnicht aus den Kapseln in den Boden diffundieren und dort als Medium dem Wachstum unerwünschter Bodenorganismen dienen können. Der Nachteil, daß höhermolekulare Medienbestandteile in der Regel langsamer verstoffwechselt werden, was hier zu einem unerwünschten, langsameren Auswachsen des Pilzes aus den Kapseln führen könnte, wurde im folgenden Versuch dadurch kompensiert, daß dem Pilz mit autoklavierten Bäckerhefezellen (Deutsche Hefe Werke, Hamburg) oder dem Hefepulver Auxoferm® (Ohly GmbH, Hamburg) Substanzen als Medium angeboten wurden, die seinen zelleigenen Verbindungen hinsichtlich Zusammensetzung und Mengenverteilung sehr ähnlich waren.

Abb. 5. 33 zeigt deutlich, daß hinsichtlich des Auswachsverhaltens Maiskleber und Hefeextrakt problemlos durch Bäckerhefe oder das Hefepulver Auxoferm® ersetzt werden können. Die Kapseln der letzten Versuchsvariante enthielten 1 % (w/w) Bäckerhefe und wurden vor dem Auslegen für zwei Stunden in einem großen Volumen Wasser gelagert. Da das Wasser nach der Lagerung noch klar war und die Kapseln kein verschlechtertes Auswachsverhalten zeigten, kann gefolgert werden, daß zumindest keine für das Wachstum von *H. rhossiliensis* benötigten Medienbestandteile aus den Kapseln herausdiffundiert sind. Da das Hefepulver Auxoferm® teurer ist als Bäckerhefe, wurden die Kapseln mit 1 % (w/w) Biofeuchtmasse und 1 % (w/w) Bäckerhefe für die weiteren Pathogenitätstests ausgewählt (s. 5. 5; Gutberlet 2000).

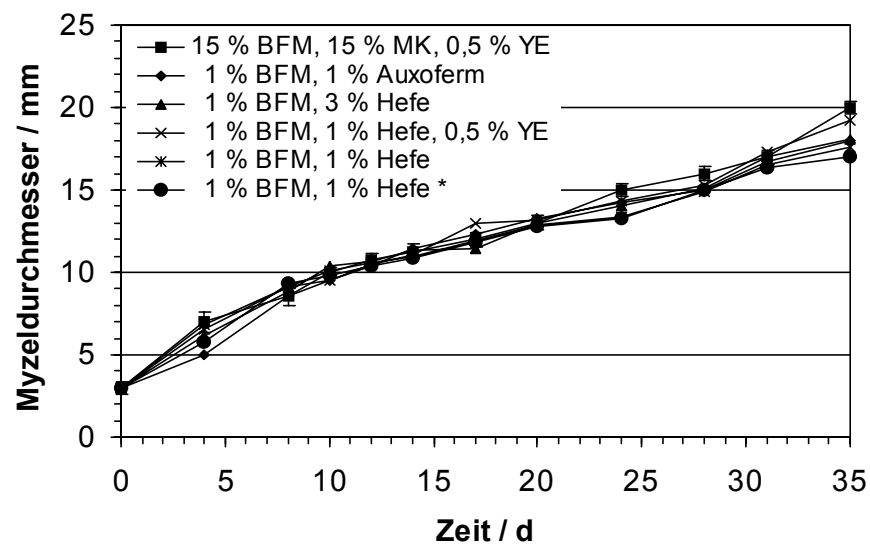


Abb. 5. 33 Auswachsen aus Kapseln mit unterschiedlichem z. T. höhermolekularem Medium ( \* ) vor dem Auslegen 2 h in einem Überschuß Wasser gelagert).

#### 5. 4. 1. 3 Sporulation

Neben dem schnellen und weitreichenden Wachstum des Myzels im Boden ist die Sporenbildung des Pilzes von entscheidender Bedeutung (s. 3. 7).

Von anderen nematophagen Pilzen ist aus der Literatur bekannt, daß sie nur dann eine besonders hohe räuberische Aktivität besitzen bzw. ihre Organe zum Fangen der Nematoden nur dann bilden, wenn sie unter Stickstofflimitierung wachsen (Hayes und Blackburn 1966 b; Rubner und Bernitzky 1992). Gutes Myzelwachstum ist dabei nicht unbedingt mit hoher räuberischer Aktivität verbunden (Hayes und Blackburn 1966 a, 1966 b). Untersuchungen zum Sporulationsverhalten von *H. rhossiliensis* sind von Lackey *et al.* (1992) durchgeführt worden. Es wurde allerdings nur gezeigt, daß das aus abgetöteten Nematoden auswachsende Pilzmyzel sich hinsichtlich Wachstum und Sporulation nicht von Myzel unterscheidet, das in Flüssigkultur angezogen wurde. Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnisse wurden nicht berücksichtigt.

In Optimierungsversuchen im kleineren Maßstab wurde daher der Einfluß verschiedener Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnisse auf das Auswachsen und die Sporulation untersucht. Da Auswachsverhalten und Sporulation nicht getrennt betrachtet werden können, sind die entsprechenden Auswachskurven (Abb. 5. 34 und Abb. 5. 36) immer den jeweiligen Sporulationsverläufen (Abb. 5. 35 und Abb. 5. 37) vorangestellt. Die Kapseln wurden hergestellt wie unter 4. 6. 1. 1 beschrieben. Die Biomassebeladung betrug 1 % Biofeuchtmasse. Zur Bestimmung der gebildeten Sporen wurden mindestens 20 auf Wasseragar ausgewachsene Kapseln gut mit Ethanol abgewaschen, die Sporensuspension durch eine Fritte filtriert und das Filtrat eingedampft. Nach Resuspension mit einer definierten Menge Triton-X-Lösung wurden die Sporen mit einer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Da unter dem Mikroskop nur „frische“ runde Sporen gezählt werden können, werden abgefallene und keimende Sporen nicht berücksichtigt. Dies erklärt auch das Abfallen der Kurven der gebildeten Sporen. Da jedoch nur die ersten 2-3 Wochen von Interesse sind, spielt dieses Problem hier keine bedeutende Rolle. Für die Abb. 5. 34 und 5. 35 wurden die unterschiedlichen C/N-Verhältnisse mit Glucose und Hefeextrakt eingestellt. Da diese Substrate für einen Einsatz in der Praxis ungeeignet sind, da sie ähnliche Diffusions- und Folgeprobleme wie Maiskleber und Hefeextrakt erwarten lassen (s. 5. 4. 1. 2), wurden im nächsten Versuch zusätzlich technische Medienbestandteile verwendet. Dabei wurde das C/N-Verhältnis aus dem ersten Versuch beibehalten. Da im ersten Versuch die Dichte des gewachsenen Pilzmyzels etwas geringer war als im zweiten Versuch, fällt auch die Anzahl der gezählten Sporen etwas geringer aus als im zweiten Versuch.

Abb. 5. 35 und 5. 37 deuten an, daß das C/N-Verhältnis des Kapselmediums einen Einfluß auf die Sporulation des Pilzes hat. Enthält das Medium wenig Stickstoff, wer-



den viele Sporen gebildet. Enthält das Kapselmedium überhaupt keinen Stickstoff, ist das Auswachsen des Pilzes gerade in den wichtigen ersten 2-3 Wochen sehr schlecht. Für genauere Aussagen sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich.

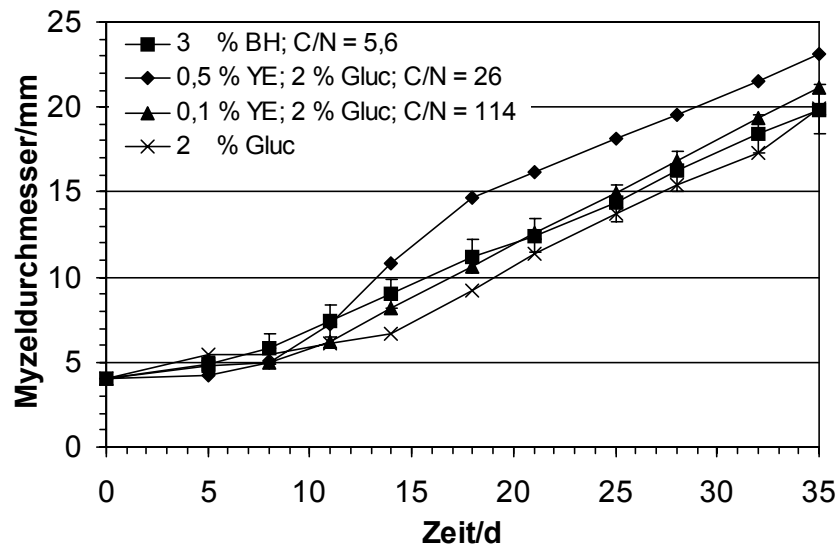


Abb. 5. 34 Auswachsverhalten bei verschiedenen mit Glucose (Gluc) und Hefeextrakt (YE) eingestellten C/N-Verhältnissen (1% BFM).

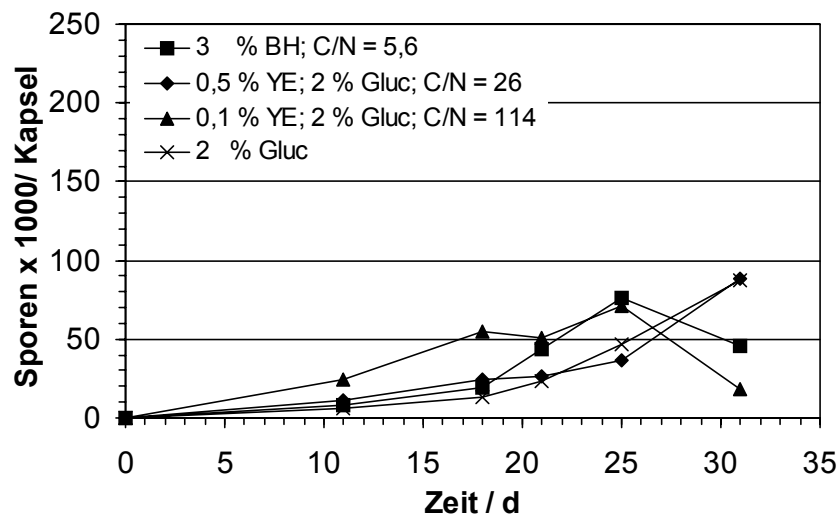


Abb. 5. 35 Anzahl der gebildeten Sporen bei verschiedenen mit Glucose (Gluc) und Hefeextrakt (YE) eingestellten C/N-Verhältnissen (BH Bäckerhefe).

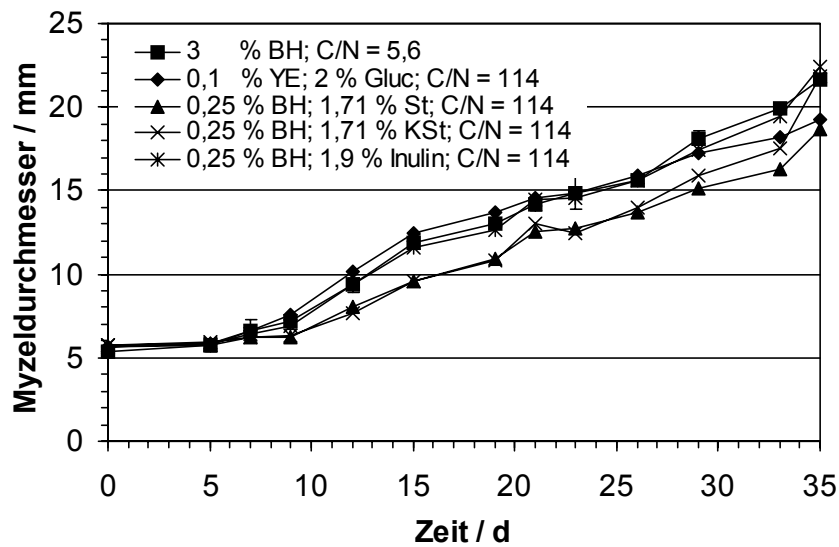


Abb. 5. 36 Auswuchsverhalten bei verschiedenen mit technischen Substraten eingestellten C/N-Verhältnissen (1 % BFM, BH Bäckerhefe, St Stärke, KSt Kartoffelstärke).

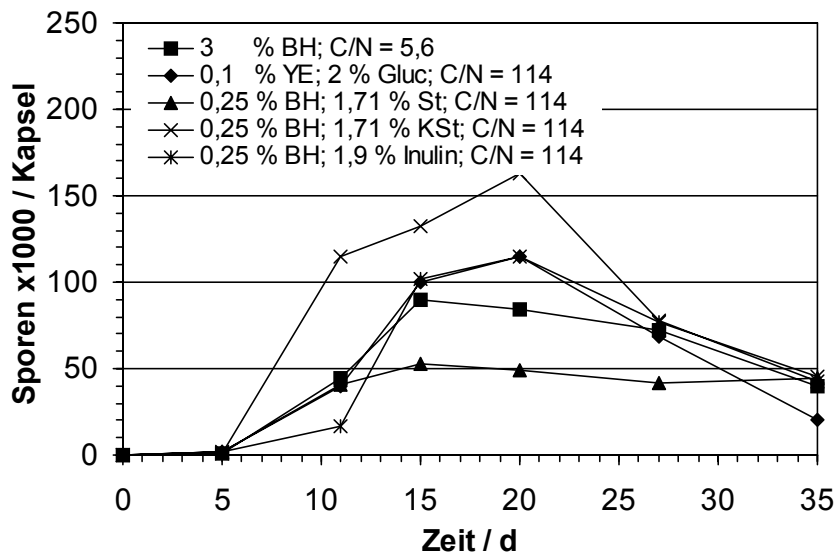


Abb. 5. 37 Anzahl der gebildeten Sporen bei verschiedenen mit technischen Substraten eingestellten C/N-Verhältnissen (1 % BFM, BH Bäckerhefe, St Stärke, KSt Kartoffelstärke).

Hinsichtlich Auswuchsverhalten und Sporulation scheint ein Kapselmedium aus 0,25 % (w/w) Bäckerhefe und 1,71 % (w/w) Kartoffelstärke bisher am besten geeignet zu sein. Pathogenitätstests mit diesen Kapseln stehen allerdings noch aus.

#### 5. 4. 1. 4 Trocknung und Lagerung

Neben Auswachsverhalten und Sporulation ist für einen Einsatz der Pilzkapseln in der Praxis eine Trocknung und Lagerung von großer Bedeutung.

Bei den ersten Trocknungsversuchen wurden feuchte Kapseln mit 1 % (w/w) Biofeuchtmasse und 3 % (w/w) Bäckerhefe entsprechend 4. 6. 1. 1 hergestellt und anschließend getrocknet, wie unter 4. 7 angegeben. Nach der Trocknung sind die Kapseln stark eingefallen und besitzen keine runde Form mehr, was sicherlich auf ihren hohen Wasseranteil von über 97 % (w/w) zurückzuführen ist.

Werden die Kapseln auf Wasseragar ausgelegt, quellen sie durch Wasseraufnahme auf und nehmen wieder ihre ursprüngliche runde Form an (Abb. 5. 38). Das starke Aufquellen kann sicher auf das reversible und reproduzierbare Quellverhalten und das hohe Wasserrückhaltevermögen des Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexes der Kapselmembran zurückgeführt werden (Philipp *et al.* 1980; s. 3. 2. 4). Für die Pilzhohlkugeln ist diese Eigenschaft der Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexe für die Praxis sehr interessant, da nach der Ausbringung in den feuchten Boden die Kapseln sofort Wasser aufnehmen, das dann für das Wachstum des Pilzes zur Verfügung steht. Durch das hohe Wasserrückhaltevermögen wird ferner einer erneuten Austrocknung der Kapseln im Boden entgegengewirkt, wenn der Boden wetterbedingt einmal trockener werden sollte.

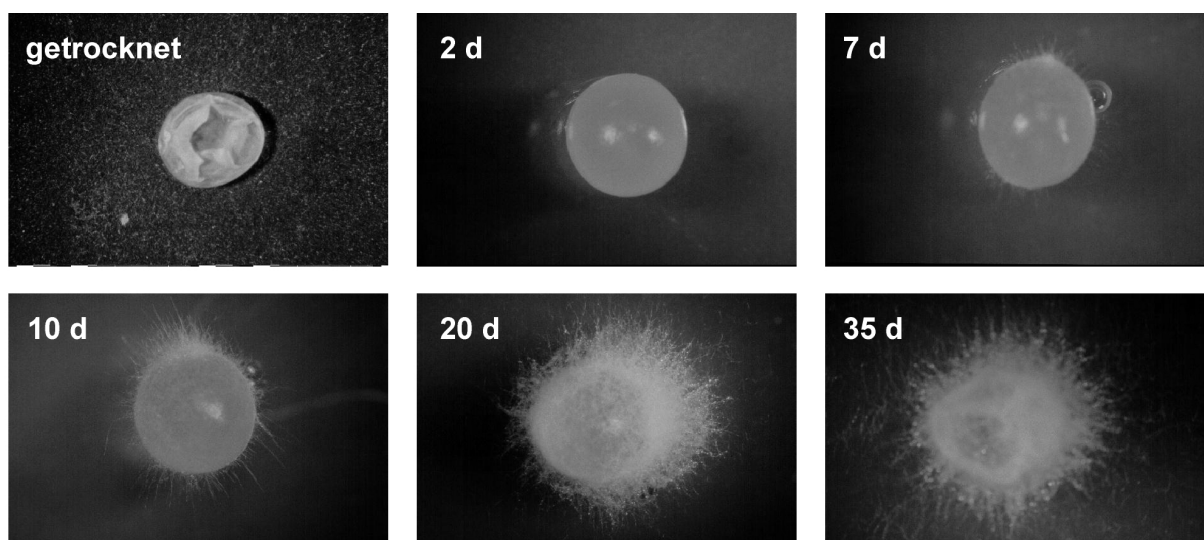


Abb. 5. 38 Aufquellen und Auswachsen aus getrockneten Kapseln (1 % BFM, 3 % Bäckerhefe).

Positiv auf die Überlebensraten bei der Trocknung können sich z. B. Trehalose, die das für biologische Makromoleküle essentielle Strukturwasser ersetzt, oder Aktivkohle auswirken, die toxische Substanzen bindet, die sich im Zellinnern durch Aufkonzentrierung anreichern können.

Kapseln unter Zusatz von 1 % (w/w) Trehalose bzw. 0,2 % (w/w) Aktivkohle wurden dabei jeweils feucht (Abb. 5. 39), auf eine Restfeuchte von etwa 5 % getrocknet (s. 4. 7; Abb. 5. 40) und getrocknet und für 72 Stunden im Dunkeln bei 50 °C gelagert (Abb. 5. 41) auf Wasser-Agar ausgelegt (s. 4. 8). Die Lagerungsbedingungen entsprechen dabei einer Lagerung von etwa 25 Jahren bei 10 °C (s. 3. 8; Hoffmann 1999).

Abb. 5. 39 zeigt, daß sich das Auswachsverhalten von *H. rhossiliensis* aus den unterschiedlich zusammengesetzten feuchten Kapseln nur unwesentlich voneinander unterscheidet. Nach dem Trocknen wachsen jedoch die Kapseln mit Zusatz von Aktivkohle deutlich schlechter aus (Abb. 5. 40).

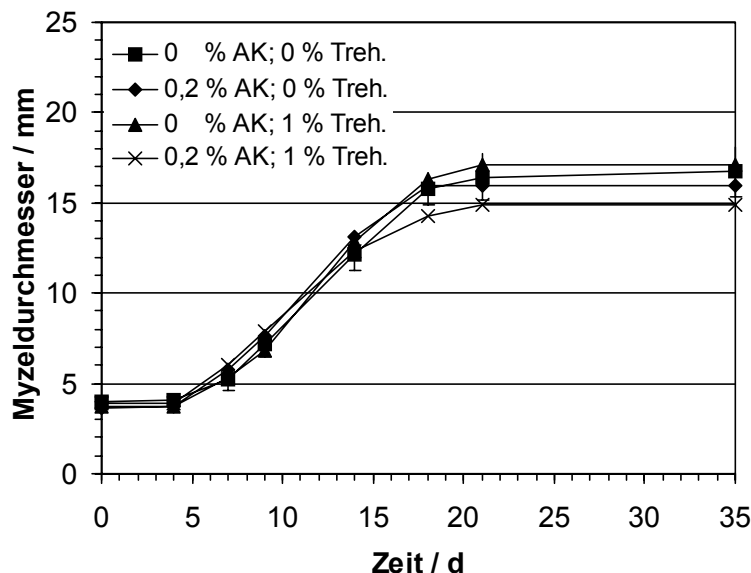


Abb. 5. 39 Auswachsen aus feuchten Kapseln (1 % BFM, 3 % Bäckerhefe, AK Aktivkohle, Treh. Trehalose).

Nach Trocknung und Lagerung ist das Auswachsverhalten aller hergestellten Kapselsorten wieder sehr ähnlich, ein positiver Effekt der Trehalose oder der Aktivkohle konnte nicht gezeigt werden (Abb. 5. 40). Der Zusatz von Aktivkohle scheint in der verwendeten Konzentration von 0,2 % (w/w) eher einen negativen Effekt auf das Auswachsen von *H. rhossiliensis* aus den Kapseln zu haben.

Bemerkenswert ist jedoch, daß sich die Kapseln auch ohne Zusätze mit nur geringem Vitalitätsverlust drei Tage bei 50 °C lagern lassen. Damit sollten die Kapseln nach Hoffmann (1999) bis zu 25 Jahre bei 10 °C lagerfähig sein.

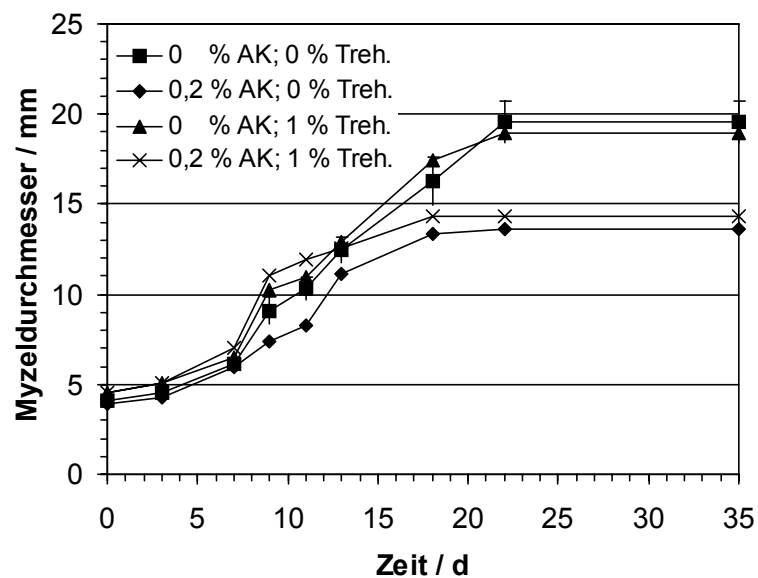


Abb. 5. 40 Auswachsen aus getrockneten (5 % Restfeuchte) Kapseln (1 % BFM, 3 % Bäckerhefe, AK Aktivkohle, Treh. Trehalose).

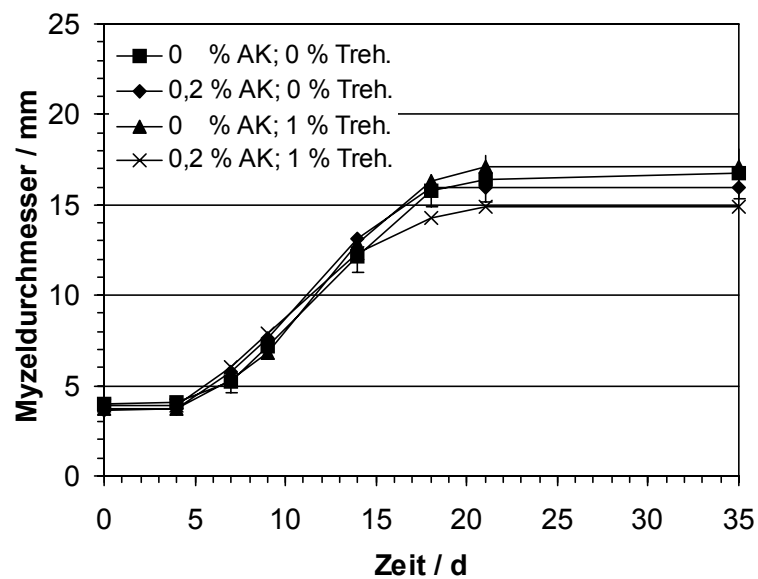


Abb. 5. 41 Auswachsen aus getrockneten (5 % Restfeuchte) und gelagerten (3 Tage bei 50 °C) Kapseln (1 % BFM, 3 % Bäckerhefe, AK Aktivkohle, Treh. Trehalose).

### 5. 4. 2 Vergleich mit Calciumalginatvollkugeln

Die in dieser Arbeit verwendeten und optimierten SEC/PDADMAC-Hohlkugeln wurden in einem Versuch mit den häufig zur Immobilisierung eingesetzten Calciumalginatvollkugeln (s. 3. 1) verglichen. Dazu wurden SEC/PDADMAC-Hohlkugeln (4. 6. 1. 1) und Calciumalginatvollkugeln (4. 6. 1. 2) mit 1 % (w/w) Biofeuchtmasse und 3 % (w/w) Bäckerhefe hergestellt und feucht (Abb. 5. 42) bzw. entsprechend 4. 7 getrocknet (Abb. 5. 43) auf Wasseragar ausgelegt und das Auswachsverhalten des Pilzes untersucht.

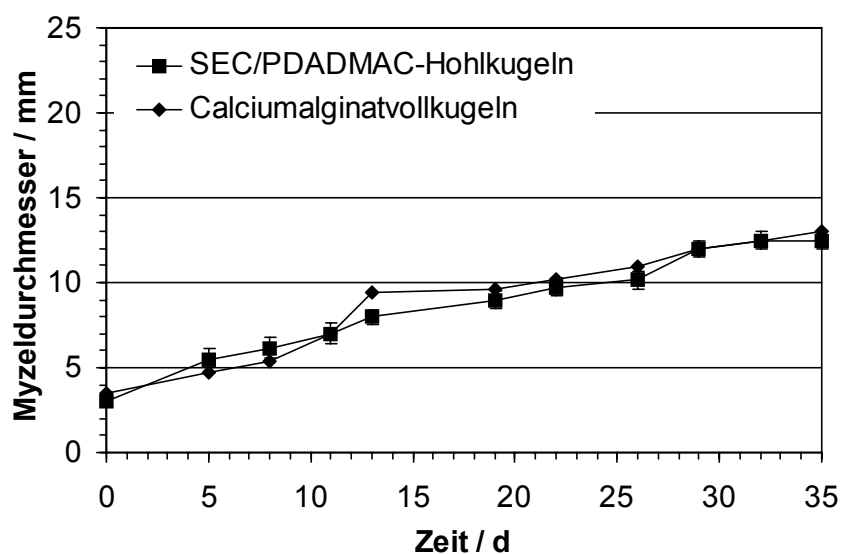


Abb. 5. 42 Auswachsen aus SEC/PDADMAC-Hohlkugeln und Calciumalginatvollkugeln (1 % BFM, 3 % Bäckerhefe).

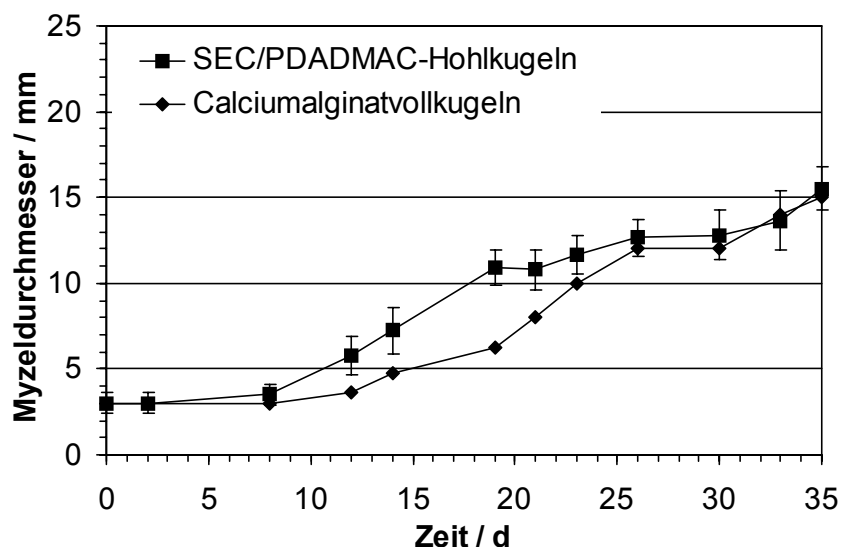


Abb. 5. 43 Auswachsen aus getrockneten SEC/PDADMAC-Hohlkugeln und Calciumalginatvollkugeln (1 % BFM, 3 % Bäckerhefe).

Bei den feucht ausgelegten Kapseln zeigten sich kaum Unterschiede im Auswachsverhalten (Abb. 5. 42), während der Pilz aus den getrockneten SEC/PDADMAC-Hohlkugeln besonders in den für die Nematodenbekämpfung wichtigen ersten zwei bis drei Wochen wesentlich schneller auswuchs als aus den Calciumalginatvollkugeln (Abb. 5. 43). Dies ist wahrscheinlich auf das Aufquellen und die damit verbundene starke Wasseraufnahme der Hohlkugeln zurückzuführen (vgl. 5. 4. 1. 4; Abb. 5. 38), die das Pilzwachstum begünstigt.

## 5. 5 Pathogenitätstests

Mit einem Teil der unter 5. 4 optimierten Kapselsorten wurden am Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde Münster der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) Pathogenitätstests mit dem Zuckerrüben nematoden *Heterodera schachtii* durchgeführt, die Bestandteil einer eigenständigen Arbeit sind (Gutberlet 2000). Die Pilzkapseln wurden in Biotests (Topfversuchen) und Kleinparzellen-Freilandversuchen (Microplots) untersucht (4. 10).

Für die ersten Versuche wurden 15 % (w/w) Biofeuchtmasse von *Hirsutella rhossiliensis* mit 15 % (w/w) Maiskleber, einem Abfallprodukt der Maisstärkegewinnung, und 0,5 % (w/w) Hefeextrakt als Medium in SEC/PADADMAC-Hohlkugeln verkapselt. Mit diesem Kapselmedium wurde in früheren Untersuchungen in Einzelfällen eine Reduzierung des Wurzelbefalls der Rübenpflänzchen mit Larven von *H. schachtii* von bis zu 92 % erreicht (Patel 1998).

In späteren Versuchen (Gutberlet 2000) wurden zwar sowohl in Biotests als auch in Microplots signifikante Befallsreduzierungen erreicht, diese gingen aber mit einer Steigerung des Frischgewichtes und des Blattanteils der Zuckerrüben einher und konnten auf das Kapselmedium Maiskleber zurückgeführt werden. Das Einbringen großer Mengen von organischem Material kann sowohl aufgrund seiner düngenden als auch seiner nematiziden Wirkung das Pflanzenwachstum beeinflussen (Stirling 1991). Der mikrobielle Abbau des organischen Materials kann zu toxischen Stoffwechselprodukten führen, die zwar den Nematodenbefall vermindern, aber auch eine schädigende Wirkung auf die jungen Pflanzen haben können. So war z. B. in allen Versuchen die Wurzellänge der Zuckerrübenpflänzchen deutlich verringert. Ferner wäre bei einer Anwendung der Kapseln mit Maiskleber und Hefeextrakt die Menge des in den Ackerboden eingetragenen Stickstoffs unverträglich hoch, was auch die Qualität der Zuckerrüben mindern kann (Geisler 1983; Bornscheuer 1986).

Die weiteren Biotests und Microplots wurden daher mit den unter 5. 4. 1. 2 optimierten Kapseln mit 1 % (w/w) Biofeuchtmasse und 3 % (w/w) Bäckerhefe als Kapselmedium durchgeführt. Die Reduktion des Nematodenbefalls der Zuckerrübenpflänzchen lag reproduzierbar bei gut 80 %. 30 bis 90 % der im Boden vorhandenen Nematodenlarven waren von *H. rhossiliensis* parasitiert. Kapseln mit Bäckerhefe und ohne Pilz oder unverkapselter freier Pilz zeigten keine Wirkung. Eine Verringerung des Bäckerhefeanteils der Kapseln von 3 auf 1 bzw. 0 % (w/w) führte zu einer entsprechenden Abnahme der Befallsreduzierung der Zuckerrübenpflänzchen und der Larvenparasitierung im Boden (Abb. 5. 44).

Durch die Formulierung von 1 % (w/w) Biofeuchtmasse mit 3 % (w/w) Bäckerhefe in SEC/PADADMAC-Hohlkugeln ist es gelungen, den nematophagen Pilz



*H. rhossiliensis* in den Boden einzubringen und eine deutliche Verringerung des Befalls von Zuckerrübenpflanzen mit den Larven des phytopathogenen Nematoden *H. schachtii* zu erreichen.

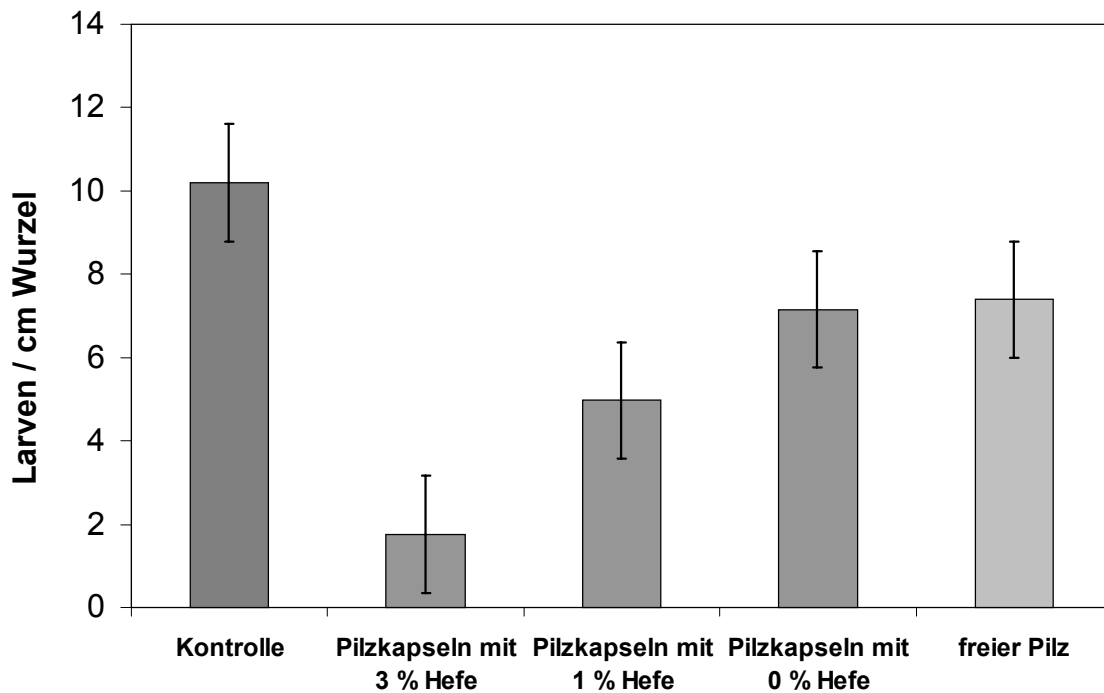


Abb. 5. 44 Wurzelbefall von Zuckerrübenkeimlingen mit Larven von *Heterodera schachtii* nach Applikation von Pilzkapseln mit unterschiedlichen Bäckerhefegehalten (1 % BFM, Gutberlet 2000).

Mit den hinsichtlich Auswachsen und Sporulation optimierten Kapseln (5. 4. 1. 3) wurden bisher keine Biotests oder Microplots durchgeführt.

Besonders aussichtsreich erscheinen in Zukunft Versuche mit 1 % (w/w) Biofeuchtmasse, 0,25 % (w/w) Bäckerhefe und 1,71 % (w/w) Kartoffelstärke, da diese Kapseln sowohl ein sehr gutes Auswachsverhalten (Abb. 5. 36) als auch eine große Zahl von Sporen (Abb. 5. 37) zeigen. Ausgehend von dieser Formulierung scheint auch eine weitere Untersuchung des Einflusses des Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnisses des Kapselmediums sinnvoll.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung mechanisch stabiler Hohlkugeln auf Basis von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen unter Verwendung von Sulfoethylcellulose (SEC) als Polyanion zur besonders schonenden Mikroverkapselung von Zellen, Enzymen und anderem Nutzmaterial, hier im speziellen dem nematophagen Pilz *Hirsutella rhossiliensis* zur biologischen Bekämpfung des Zuckerrüben nematoden *Heterodera schachtii*.

Die in dieser Arbeit verwendeten Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Hohlkugeln werden durch Eintropfen einer wäßrigen Lösung eines Polyanions in die wäßrige Lösung eines Polykations gebildet (Symplex-Fällung).

Als Polyanion wurde Sulfoethylcellulose (SEC) verwendet, bei der es sich um einen Celluloseether handelt, der im Technikumsmaßstab in einer heterogenen Reaktion des wichtigen nachwachsenden Rohstoffes Cellulose mit Vinylsulfonsäure hergestellt wurde.

Auch bei den aus einer Vorauswahl zur Vernetzung verwendeten Polykationen Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) und Chitosan handelt es sich um technische Produkte.

Das lineare Polymer PDADMAC dient u. a. als Flockungsmittel zur Wasseraufbereitung und Abwasserbehandlung und wird technisch durch radikalische Polymerisation aus dem Monomer Diallyldimethylammonium erhalten. Die Herstellung des Monomers erfolgt durch zweifache Alkylierung des preiswerten Dimethylamin mit Allylchlorid in wäßriger alkalischer Lösung.

Chitosan (Poly[ $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-desoxy-D-glucopyranose]) wird durch N-Deacetylierung aus Chitin hergestellt, dem zweitwichtigsten nachwachsenden Rohstoff nach Cellulose. Chitin ist z. B. Bestandteil der Schalen von Krustaceen und Insekten, kommt aber auch bei Pilzen und Hefen vor. Technisch wird Chitosan in großem Maßstab unter Zusatz von starker Natronlauge bei hohen Temperaturen aus Krabbenchalen gewonnen.

Durch Eintropfen einer wäßrigen SEC-Lösung in wäßrige Lösungen von PDADMAC oder Chitosan werden Hohlkugeln erhalten. An der Phasengrenze zwischen den beiden unterschiedlich geladenen Polyelektrolyten kommt es spontan zur Ausbildung einer Membran, die beide Phasen voneinander trennt. Alle weiteren Polyelektrolyt-Moleküle müssen nun durch diese Primärmembran diffundieren, um an der Reaktion teilzunehmen. Morphologische Untersuchungen zeigten, daß die Membran zum Tropfeninnern hin eine immer lockerer aufgebaute Struktur besitzen. Die Reaktion bzw. das Wachstum der Membran kommt zum Stillstand, wenn der Diffusionswider-

stand so groß geworden ist, daß keine PDADMAC- bzw. Chitosan-Moleküle mehr nachgeliefert werden oder die SEC vollständig abreagiert ist.

Bei den im Rahmen der Untersuchungen hergestellten Modellkapseln ( $\varnothing$  ca. 2,5 – 2,7 mm) wurde die vollständige Reaktion der SEC nachgewiesen. Das Reaktionsende deutete sich zusätzlich dadurch an, daß die Hohlkugeln in der Vernetzerlösung kleine Vertiefungen bekamen und zu schrumpfen begannen. Die Reaktions- bzw. die Vernetzungszeit hing stark von den Konzentrationen beider Polymere ab.

Eine unvollständige Reaktion der SEC wurde nur bei größeren Kapseln ( $\varnothing$  ab ca. 2,8 mm) beobachtet. Durch das verringerte Verhältnis von Oberfläche zu Volumen stand zwar mehr SEC zur Kapselmembranbildung zur Verfügung, diese konnte aber nicht vollständig abreagieren, da der Diffusionswiderstand durch die bereits gebildete Kapselmembran so groß geworden war, daß keine PDADMAC- bzw. Chitosan-Moleküle mehr nachgeliefert werden konnten.

Als Maß für die mechanische Stabilität der Hohlkugeln wurde die Kraft verwendet, die aufgewendet werden muß, um die Hohlkugel zum Zerplatzen zu bringen. Für die Bildung mechanisch stabiler Hohlkugeln müssen beide Komponenten hinsichtlich ihrer Polymercharakteristik (Molmasse, Molmassenverteilung, Ladungsdichte) aufeinander abgestimmt sein.

Zahlreiche Vorversuche ergaben, daß nur dann Kapseln erhalten wurden, wenn der Substitutionsgrad der SEC zwischen 0,2 und 0,9 lag. Am besten geeignet waren eine SEC mit einer Molmasse von 132.600 g/mol und einem Substitutionsgrad von 0,42 und ein PDADMAC (Ladungsdichte 100 %) mit einer mittleren Molmasse von 60.800 g/mol bzw. ein Chitosan mit einer mittleren Molmasse von 6.000 g/mol und einem Deacetylierungsgrad von 88 %.

Die Konzentrationen der Polymerlösungen spielen bei der Bildung mechanisch stabiler Hohlkugeln eine entscheidende Rolle. Mechanisch stabile Hohlkugeln von bis zu 7 N aus SEC und PDADMAC wurden z. B. bei SEC-Konzentrationen von mehr als 2 % und Vernetzerkonzentrationen von 4 % und mehr erhalten. Beim Eintropfen einer 1,5 %igen SEC-Lösung in eine 2 bzw. 3 %ige PDADMAC-Lösung wurden keine Kapseln erhalten.

Wurden die Hohlkugeln statt in deion. Wasser in einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9 % (w/w) NaCl) gelagert, fielen die Stabilitäten um etwa 80 % geringer aus. Die Stabilitätsminderung erwies sich als fast vollkommen reversibel. Wurde die Lagerungslösung über 25 Tage täglich gewechselt, nahm die Stabilität der Hohlkugeln nach drei Wechseln der Lagerungslösung um 25 % ab und blieb danach konstant. Kapseln, die aus autoklavierten SEC- und PDADMAC-Lösung hergestellt wurden, wiesen eine um 40 % verminderte mechanische Stabilität auf.

Auch bei Verwendung von Chitosan als kationisches Vernetzungsmittel war die mechanische Stabilität der Hohlkugeln von den Konzentrationen der Polymerlösungen abhängig. Mit zunehmender SEC-Konzentration nahm die mechanische Stabilität der Kapseln zu, während die Stabilität der Kapseln in Bezug auf die Chitosan-Konzentration ein Maximum durchlief, welches sich mit steigender SEC-Konzentration zu höheren Chitosan-Konzentrationen hin verschob. Die stabilsten Kapseln (4,4 N) ergaben sich bei einer SEC-Konzentration von 3,5 % und einer Chitosan-Konzentration von 8,0 %.

Die Stabilitätsminderung bei Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung war mit 25 % wesentlich geringer als bei den SEC/PDADMAC-Kugeln.

Bei den SEC/Chitosan-Hohlkugeln spielte allerdings der pH-Wert eine wichtige Rolle, da Chitosan nur nach Protonierung der Aminogruppen als Polykation vorliegt und mit SEC einen Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplex bilden kann. Die stabilsten Kapseln wurden erhalten, wenn das Chitosan bei pH 3,5 gelöst und eingetropfte wurde. Die erhaltenen Kapseln waren bei Lagerung im sauren pH-Bereich am stabilsten. Bei pH>8 lösten sich die Kapseln auf.

Sowohl die für SEC/PDADMAC-Kapseln mit 7 N als auch die für SEC/Chitosan-Kapseln mit 4,4 N im Rahmen dieser Arbeit gemessenen mechanischen Stabilitäten liegen weit über den experimentell auf sehr ähnliche Weise bestimmten Stabilitäten vergleichbarer Cellulosesulfat/PDADMAC-Kapseln, deren mechanische Festigkeit mit durchschnittlich 1 bis 1,5 N, maximal mit 2,5 N angegeben wird.

Für einen großflächigen Einsatz von verkapseltem *H. rhossiliensis* zur biologischen Schädlingsbekämpfung wurde eine Pilzanzucht im Schüttelkolben und Fermenter etabliert und hinsichtlich der Bildung fein disperser Biomasse optimiert.

Tab. 6. 1 Zusammensetzung des optimierten Flüssigmediums (pH 6,0).

Medienbestandteil	% (w/w)
Glucose	2,0
Hefeextrakt	0,5
MES-NaOH-Puffer	0,4
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,1
Penicillin	0,0025
Streptomycin	0,0025
deion. Wasser	96,595

Das Temperaturoptimum des in dieser Arbeit verwendeten *H. rhossiliensis*-Isolates lag bei 20 °C. Bei 30 °C war kein Pilzwachstum mehr zu beobachten. Einmal Temperaturen von 35 °C oder mehr ausgesetzt, zeigte der Pilz keinerlei Wachstum mehr.

Hinsichtlich des pH-Wertes sind die Ansprüche wesentlich weiter gefaßt. Zwischen pH 5,0 und 7,0 war das Pilzwachstum sehr ähnlich, bei pH 8,0 war das Myzel deutlich dünner. Im sauren pH-Bereich wächst das verwendete *H. rhossiliensis*-Isolat noch bei pH 3,0 und toleriert kurzzeitig sogar ein noch saureres Milieu.

Tab. 6. 1 zeigt die Zusammensetzung des optimierten Flüssigmediums, wie es zur Anzucht von *H. rhossiliensis* im Schüttelkolben verwendet wurde. Mit nur 1 % (w/w) Glucose und ohne MES-NaOH-Puffer, Penicillin und Streptomycin wurde es auch für die Fermentationen eingesetzt.

Viele Pilze, darunter auch *H. rhossiliensis*, bilden Pellets während der Kultivierung in flüssigen Medien, die jedoch unerwünscht sind, da das Myzel im Innern der Pellets aufgrund des mit zunehmender Schichtdicke immer größer werdenden Transportwiderstandes für Stoffwechseledukte und Sauerstoff schlecht versorgt wird und an Vitalität einbüßt oder sogar ganz abstirbt.

Bei langen Inkubationszeiten in wenig gerührten oder geschüttelten flüssigen Medien wurde ab einem Pelletdurchmesser von 1,7 mm die Bildung von Pilzhohlkugeln beobachtet, während kleinere Pellets Vollkugeln waren. Die Wanddicke der Hohlkugeln war annähernd konstant und betrug 0,5 mm bis 0,8 mm. Ihr Inneres war mit Flüssigkeit gefüllt. Vereinzelt wurde das Auswachsen von neuem Pilzmyzel auf Basis der abgestorbenen und lysierten Zellen in den Pilzhohlkugeln beobachtet.

Die Unterdrückung der unerwünschten Pelletbildung und die Bildung fein disperser Biomasse gelang sowohl im Schüttelkolben als auch im Fermenter.

Die Anzucht von *H. rhossiliensis* für die Verkapselungsversuche und zur Inokulation der Fermenter erfolgte in 1l-Schüttelkolben mit drei Schikanen bei 20 °C. Um das anwachsende Pilzmyzel in den Schüttelkolben nicht durch zu hohe Scherkräfte zu schädigen, wurden die Kulturen bis zum vierten Tag bei 80 UpM geschüttelt und danach bei 120 UpM.

Die Ausbeute an Biotrockenmasse lag durchschnittlich bei 4,1 g·l<sup>-1</sup>. Das entspricht etwa 50 g·l<sup>-1</sup> Biofeuchtmasse. Der Trockensubstanzgehalt der Biofeuchtmasse betrug durchschnittlich 8 %. Die Glucose war mit etwa 5 g·l<sup>-1</sup> zum Zeitpunkt der Ernte noch nicht vollständig verbraucht.

Bei Fermentationen in einem 5 l-Fermenter mit länglicher Geometrie konnte gezeigt werden, daß das Wachstum von *H. rhossiliensis* durch das Wachstumsmodell nach Monod beschrieben werden kann. Die unter Annahme der Gültigkeit des Modells nach Monod erwartete Biotrockenmasse am Ende der Fermentation zeigte eine brauchbare Übereinstimmung mit den tatsächlich gemessenen Ausbeuten.

In mehreren Fermentationen stellte sich eine durchschnittliche Verdopplungszeit der Pilzmasse von 16 bis 17 h ein. Die maximale Wachstumsrate wurde nach jeweils

25 h erreicht und lag bei etwa  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , was einer minimalen Verdopplungszeit von rund 11 h entspricht (Tab. 6. 2).

Tab. 6. 2 Fermentative Herstellung fein disperser Biomasse von *H. rhossiliensis*

<b>Fermenter:</b>	
Arbeitsvolumen / l	5,0
Totalvolumen / l	7,5
Längenverhältnis h/d	2,0
<b>Einstellungen:</b>	
Rührerdrehzahl / UpM	400
Begasungsrate / V/VM	0,4
Begasungsrate / l/min	2,0
pH-Wert	6,0
Temperatur / °C	20,0
<b>Ergebnisse:</b>	
Biotrockenmasse (nach etwa 50 h) / $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	5,0
Max. spezifische Wachstumsrate $\mu_{\text{max}} / \text{h}^{-1}$	0,066
Min. Verdopplungszeit $t_d / \text{h}$	10,5
Durchschnittliche Verdopplungszeit $t_d / \text{h}$	16,9
Max. spezifische Substrataufnahmerate / $\text{h}^{-1}$	0,075
Ertragskoeffizient (nach etwa 50 h)	0,57
Anteil des Pilzmyzels < 500 $\mu\text{m}$ / %	93

Es hat sich gezeigt, daß bereits die Beschaffenheit des Pilzmyzels der zum Animpfen des Fermenters verwendeten Vorkultur die Größe des Myzels bei der Fermentation beeinflusst.

Wurde zur Anzucht der Vorkultur ein Schüttelkolben ohne Schikanen verwendet, zeigte *H. rhossiliensis* ein pelletförmiges Wachstum. Weniger als 40 % des Pilzmyzels waren kleiner als 500  $\mu\text{m}$  und der größte Anteil fand sich bei über 1000  $\mu\text{m}$ . Bei einer anschließenden Fermentation zeigten sich sehr ähnliche Verhältnisse.

Wenn zur Anzucht der Vorkultur Kulturkolben mit Schikanen verwendet wurden, bildete sich fein disperses Pilzmyzel. Etwa 95 % der gebildeten Biomasse waren kleiner als 500  $\mu\text{m}$ . Die größte Fraktion lag bei 300  $\mu\text{m}$  und hatte einen Anteil von etwa 45 %. Bei Verwendung dieser fein dispersen Biomasse als Inokulum wächst auch im Fermenter feines Pilzmyzel heran. Dabei spielte der Leistungseintrag in den Fermenter durch verschiedene Rührerdrehzahlen (100 und 400 UpM) kaum eine Rolle. Die Unterschiede zwischen den Partikelgrößenverteilungen beider Fermentationen waren sehr gering. Die Hauptfraktion lag jeweils im Partikelgrößenintervall zwischen 200 und 300  $\mu\text{m}$ . Bei geringem Leistungseintrag enthielt sie 40 %, bei hohem Leistungseintrag 42 % der Trockenmasse. Unter 500  $\mu\text{m}$  lagen bei schwachem Rühren 85 %, bei starkem Rühren 93 % der Trockenmasse. Das unerwünschte Wachstum von Pellets wird also auch bei nur 100 UpM erfolgreich unterdrückt. Bei einer höhe-

ren Drehzahl wurde jedoch eine größere Pilzausbeute erzielt ( $5,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Biotrockenmasse bei 400 UpM gegenüber  $3,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  bei 100 UpM).

Da der Einsatz freier Organismen zur biologischen Nematodenbekämpfung in der Regel nicht erfolgreich ist, erfolgt in dieser Arbeit der Einschluß des Nützlings *H. rhossiliensis* in Kapseln.

Die klassische Formulierung in Alginat bringt gerade bei einem massenweisen Einsatz in der biologischen Schädlingsbekämpfung aufgrund des hohen Preises, der Förderung des Wachstums unerwünschter Mikroorganismen und einer eventuell auftretenden Beeinträchtigung des Wurzelwachstums Nachteile mit sich. Für den Einschluß des Pilzes wurden daher im Rahmen dieser Arbeit Hohlkugeln auf Basis von SEC und PDADMAC verwendet (s. o.). Neben dem Schutz und der kontrollierten Freisetzung des nematophagen Pilzes soll die Formulierung auch die Lagerung und die einfache Ausbringung der Organismen ermöglichen. Eine Ausbringung der Kapseln in den Boden um den Zuckerrübensamen herum sollte sich mit in der landwirtschaftlichen Praxis bereits vorhandenen Maschinen realisieren lassen. Diese Maschinen werden normalerweise dazu verwendet, während der Aussat gleichzeitig in Kapseln formulierten Dünger in der Umgebung des Samens in den Boden einzuarbeiten.

Das Auswachsverhalten von *H. rhossiliensis* aus den Kapseln wurde durch Auslegen der verschiedenen im Rahmen der Optimierung hergestellten Kapseln auf Wasseragar und Beobachtung des Durchmessers des kreisförmig auswachsenden Myzels untersucht.

Um den angezogenen bzw. fermentierten Pilz effektiv nutzen zu können, sollte der Biomassegehalt der Kapseln möglichst gering sein. Eine Variation des Biofeuchtegehaltes zwischen 15 und 0,1 % (w/w) zeigte, daß sich kaum Auswirkungen auf das Auswachsverhalten aus den Kapseln ergaben. Lediglich die Kapseln mit nur 0,1 % (w/w) Biomasse zeigten ein geringfügig schlechteres Auswachsverhalten.

Für einen guten Schutz der Zuckerrübenpflanzen muß der Pilz möglichst schnell und möglichst weit aus den Kapseln in den Boden auswachsen. Da *H. rhossiliensis* nur über geringe saprophytische Eigenschaften verfügt, ist das mitverkapselte Medium hierfür von entscheidender Bedeutung.

Ausgehend von einem Kapselmedium auf Basis von Maiskleber, einem Abfallprodukt der Maisstärkegewinnung, und Hefeextrakt wurden zwar erfolgreiche Optimierungen durchgeführt, jedoch zeigten Pathogenitätstests mit dem Zuckerrüben nematoden *H. schachtii*, die am Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde Münster der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) durchgeführt wurden

(Gutberlet 2000), daß diese Kapseln ungeeignet waren. Der mikrobielle Abbau des reichlich in den Boden eingebrachten Maisklebers führte durch Stoffwechselprodukte zwar teilweise zu einer Verringerung des Nematodenbefalls, hatte aber auch eine schädigende Wirkung auf die jungen Pflanzen, die sich in einer deutlichen Verringerung der Wurzellänge zeigte. Ferner wäre bei einer Anwendung der Kapseln mit Maiskleber und Hefeextrakt die Menge des in den Ackerboden eingetragenen Stickstoffs unverträglich hoch, was auch die Qualität der Zuckerrüben mindern kann. Der mitverkapselte Hefeextrakt hatte zusätzlich noch den Nachteil, daß er zu niedermolekular ist und sehr schnell aus den Kapseln diffundiert.

Als Alternative sind daher ausschließlich höhermolekulare Medienbestandteile einsetzbar, die nur langsam oder garnicht aus den Kapseln in den Boden diffundieren und dort als Medium dem Wachstum unerwünschter Bodenorganismen dienen können. Der Nachteil, daß höhermolekulare Medienbestandteile in der Regel langsamer verstoffwechselt werden, was hier zu einem unerwünschten, langsameren Auswachsen des Pilzes aus den Kapseln führen könnte, wurde in den folgenden Optimierungen dadurch kompensiert, daß dem Pilz mit autoklavierten Bäckerhefezellen Substanzen als Medium angeboten wurden, die seinen zelleigenen Verbindungen hinsichtlich Zusammensetzung und Mengenverteilung sehr ähnlich waren.

Kapseln mit 1 % (w/w) Biofeuchtmasse und 3 % (w/w) Bäckerhefe als Kapselmedium zeigten ein vergleichbares Auswachsverhalten wie die Kapseln mit Maiskleber und Hefeextrakt. Mit diesen Kapseln konnte der Nematodenbefall der Zuckerrübenpflanzen reproduzierbar um gut 80 % reduziert werden. 30 bis 90 % der im Boden vorhandenen Nematodenlarven wurden von *H. rhossiliensis* parasitiert. Kapseln ohne Pilz oder unverkapselter freier Pilz zeigten dagegen keine Wirkung.

Neben dem schnellen und weitreichenden Wachstum des Myzels im Boden ist für eine gute Wirkung auch die Sporenbildung des Pilzes von entscheidender Bedeutung. Von anderen nematophagen Pilzen ist bekannt, daß sie nur dann eine besonders hohe räuberische Aktivität besitzen bzw. ihre Organe zum Fangen der Nematoden nur dann bilden, wenn sie unter Stickstofflimitierung wachsen. Dies deutet sich auch für *H. rhossiliensis* an. Ein Kapselmedium aus 0,25 % (w/w) Bäckerhefe und 1,71 % (w/w) Kartoffelstärke, bei dem der Kohlenstoffanteil weit überwiegt, verband gutes Auswachsverhalten mit guter Sporulation und enthält keine niedermolekularen Substanzen, die im Boden Probleme verursachen könnten. Pathogenitätstests mit diesen Kapseln stehen allerdings noch aus.

Für einen Einsatz in der Praxis sollten die Pilzkapseln getrocknet und gelagert werden können. Kapseln mit 1 % (w/w) Biofeuchtmasse und 3 % (w/w) Bäckerhefe waren nach der Trocknung stark eingefallen und besaßen keine runde Form mehr, sind aber nach dem Auslegen auf Wasseragar durch Wasseraufnahme wieder aufge-



quollen und haben ihre ursprüngliche runde Form wieder angenommen. Das starke Aufquellen kann sicher auf das reversible und reproduzierbare Quellverhalten und das hohe Wasserrückhaltevermögen des Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexes der Kapselmembran zurückgeführt werden. Für die Pilzhohlkugeln ist diese Eigenschaft der Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexe für die Praxis von Vorteil, da sie nach der Ausbringung die Kapseln sofort Wasser aus dem Boden aufnehmen, das dann für das Wachstum des Pilzes zur Verfügung steht.

Zusätze zur Verbesserung der Trocknungseigenschaften wie Trehalose, die das für biologische Makromoleküle essentielle Strukturwasser ersetzen kann, oder Aktivkohle, die toxische Substanzen bindet, die sich im Zellinnern durch Aufkonzentrierung anreichern können, haben zu keiner Verbesserung der Trocknungseigenschaften geführt.

Bemerkenswert ist jedoch, daß sich die Kapseln auch ohne Zusätze mit nur geringem Vitalitätsverlust drei Tage bei 50 °C lagern lassen. Nach diesem beschleunigten Lagerungstest sollten die Kapseln bis zu 25 Jahre bei 10 °C lagerfähig sein.

**7                   Anhang**  
**7. 1               Literaturverzeichnis**

- A**bletshauser, C. (1993). Vernetzte Polymerfilme aus wäßrigen Lösungen zur Steuerung der Wirkstofflibration. Entwicklung eines Sprühverfahrens. Dissertation Universität Regensburg.
- Alam, M. M. (1990). Nematode destroying fungi. In: Jairajpuri, M. S., Alam, M. M. und Ahmad, I. (Hrsg.). Nematode bio-control: aspects and prospects. CBS Publishers & Distributors, Delhi, Indien.
- Alexandratos, N. (1995). World Agriculture: Towards 2010, An FAO Study. Food and Agriculture Organization of the United Nations, John Wiley & Sons, New York.
- Anand, S. C., Wrather, J. A. und Shumway, C. R. (1985). Soybean genotypes with resistance to races of soybean cyst nematode. Crop Science 25, 1073-1075.
- Anand, S. C., Koenning, S. R. und Shama, S. B. (1995). Performance of blends of soybean cyst nematode resistant and susceptible cultivars. Crop Science 35, 524-528.
- Anonym (1970). Estimated crop losses from plant-parasitic nematodes in the United States. Report of the Soc. Nem. Comm. on Crop Losses.
- Anonym (1997). Stand der Freisetzung gentechnisch veränderter Zuckerrüben. Zuckerrübe 46, 4, 170-171.
- Anonym (1998 a). Den Fadenwürmern geht es an den Kragen. Esso-Landkurrier 1, 16-17.
- Anonym (1998 b). Pflanzenschutz: Forschung wird teurer. GIT Labor-Fachzeitschrift 11, 1103.
- Anonym (1998 c). Pflanzenschutz-Novelle schreibt hohe Sicherheitsstandards fort. Chemanager 2.
- Anonym (1998 d). Pflanzenschutzmittel: Wirkstoffmengen in EU-Ländern rückläufig. Chemanager 2.
- Anonym (1998 e). Bakteriengifte: Schnelle Resistenz. DLG-Mitteilungen 2, 64.
- Anonym (1999 a). Steuerhammer auf den Pflanzenschutz. DLG-Mitteilungen 10, 6-7.
- Anonym (1999 b). Bauern stopfen die Löcher im Haushalt. DLG-Mitteilungen 11, 6-7.
- Anonym (1999 c). Biotechnik: Genveränderte Nutzpflanzen sind nicht so resistent wie angenommen – Schädlinge schlagen Gen-Pflanzen ein Schnippchen. VDI Nachrichten vom 01.10.1999.

- Arshady, R. (1999). Microspheres, microcapsules & liposomes. Vol. 1: Preparation & chemical applications. Citus Books, London, Großbritannien.
- Atlas der Krankheiten und Schädlinge der Rübe (1985). Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin, 136 – 137.
- B**ader, H. J. und Birkholz, E. (1996). Chitin - Ein wertvolles Polysaccharid aus Krabbenpanzern. Praxis der Naturwissenschaften Chemie 6, 45.
- Baron, R. L. (1994). A carbamate insecticide: a case study of Aldicarb. Environmental Health Perspectives 102, Supplement 11, 23-27.
- Barron, G. L. (1977). The nematode-destroying fungi. Canadian Biological Publications, Guelph, Ontario, Canada.
- Bell, C. H., Price, N. und Chakrabarti, B. (1996). Agrochemicals and Plant Protection: The Methyl Bromide Issue. John Wiley & Sons, Chichester, Großbritannien.
- Bergman, B. H. H. (1958). Het bietencystenaltje en zijn bestrijding. V. Enige microscopische waarnemingen betreffende de ontwikkeling van larven van *Heterodera schachtii* in de wortels van vatbare en resistente planten. Mededeling Instituut voor Rationele Suikerproductie, Bergen op Zoom, 28, 151-168.
- BBA - Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (2000). Liste der zugelassenen Pflanzenschutzmittel. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Hrsg.). Messeweg 11/12, D – 38140 Braunschweig. Oder: <http://www.bba.de>
- Börner, H. (1983). Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. UTB Ulmer, Stuttgart.
- Bornscheuer, E. (1986). Zucker- und Futterrüben (*Beta vulgaris* L.). In: Oehmichen, J. (Hrsg.). Pflanzenproduktion - Band 2: Produktionstechnik. Verlag Paul Parey, Berlin, 385-431.
- Braun, A. R., Lukeman, T. C. und Markus, M. (ICI Australia Ltd.) (1979). Depressant for use in flotation of ores. Australisches Patent Nr. 502, 457.
- Bridge, J. (1987). Control strategies in subsistence agriculture. In: Brown, R. H. und Kerry, B. R. (Hrsg.). Principles and practice of nematode control in crops. Academic Press, London, Großbritannien.
- Bridge, J. (1996). Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. Annual Review of Phytopathology 34, 201-225.
- Brown, R. H. (1987). Control strategies in low-value crops. In: Brown, R. H. und Kerry, B. R. (Hrsg.). Principles and practice of nematode control in crops. Academic Press, London, Großbritannien.
- Brown, R. H. und Kerry, B. R. (1987). Principles and practice of nematode control in crops. Academic Press, London, Großbritannien.

- Buchholz, K. und Kasche, V. (1997). Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Bugenberg de Jong, H. G. (1949). Role of pH and mixing proportion in complex coagulation. In: Kruyt, H. R. (Hrsg.). Colloid Science. Elsevier, Amsterdam, Niederlande 2, 10, 335-429.
- Bunt, J. A. (1975). Effect and mode of action of some systemic nematocides. Medd. Land. Hooges. Wageningen 75, 10, 1-128.
- Burges, H. D. (1998). Formulation of microbial biopesticides – Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Burrows, P. R., Kerry, B. R. und Perry, R. N. (1994). New approaches to plant-parasitic nematode control. Journal of Zoology 232, 341-346.
- Butler, G. B. (1992). Cyclopolymerisation and Cyclocopolymerisation. Marcel Dekker, New York, USA.
- Cassidy, M. B., Lee, I. I. und Trevors, J. T. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. Journal of Industrial Microbiology 16, 79-101.
- Cayrol, J. C. und Frankowski, J. P. (1980). Connaissances nouvelles sur le champignon nématophage *Arthrobotrys irregularis* (Royal 350). P. H. M. – Revue Horticulture 203, 33-38.
- Cayrol, J. C., Castet, R. und Samson, R. A. (1986). Comparative activity of different *Hirsutella* species towards three plant parasitic nematodes. Revue Nématologique 12, 331-336.
- Chandy, T. und Sharma, C. P. (1991). Biodegradable chitosan matrix for the controlled release of steroids. Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology 19, 4, 745-760.
- Chang, T. M. S. (1972). Artificial Cells. In: Kugelmass, I. N. (Hrsg.). The Bannerstone Division of American Lectures in Living Chemistry. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA.
- Chatin, J. (1888). Sur la structure des téguments de l'*Heterodera schachtii* et sur les modifications qu'ils présentent chez les femelles fécondées. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences Paris 107, 139-141.
- Chatin, J. (1891). L'angiullule de la betterave (*Heterodera schachtii*). Bulletin d'information du Ministère de l'Agriculture Paris 10, 457-506.
- Chibata, I. Tosa, T. und Sato, T. (1986). Immobilized cells and enzymes. Journal of Molecular Catalysis 37, 1-24.

- Chibata, I. Tosa, T. und Sato, T. (1987). Application of immobilized biocatalysts in pharmaceutical and chemical industries. In: Rehm, H.-J. und Reed, G. (Hrsg.). *Biotechnology*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 7 a, 653-684.
- Cohen S. Z., Creegers, S. M., Carsel, R. F. und Enfield, G. G. (1984). Potential groundwater contamination from agricultural pesticides. In: Krueger, R. F. und Seiber, J. N. (Hrsg.). *Treatment and Disposal of Pesticide Waters*. ACS Symposium Series 259. American Chemical Society, Washington, USA, 285-325.
- Cooke, R. C. (1964). Ecological characteristics of nematode-trapping Hyphomycetes. II. Germination of conidia in soil. *Annals of Applied Biology* 54, 375-379.
- Cooke, R. C. (1968). Relationship between nematode-destroying fungi and soil-borne phytonematodes. *Phytopathology* 58, 909-913.
- Crowe, J. H. und Crowe L. M. (1992). Überleben ohne Wasser. *Biologie in unserer Zeit*, 22, 28-32.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews* 3, 121-147.
- Dackman, C., Jansson, H. B. und Nordbring-Hertz (1992). Nematophagous fungi and their activities in soil. In Stotzky, G. und Bollang, J. M. (Hrsg.): *Soil biochemistry*, Volume 7, Marcel Dekker, New York, USA.
- Daiichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd. (1984 a). Drilling mud compositions. *Japanische Patentschrift* Nr. JP 59,187,078.
- Daiichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd. (1984 b). Drilling-mud additives for water-loss prevention. *Japanische Patentschrift* Nr. JP 59,193,980.
- Daly, M. M. und Knorr, D. (1988). Chitosan-alginate complex coacervate capsules: effects of calcium chloride, plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability. *Biotechnology Progress* 4, 2, 76-80.
- Danilov, S. N. und Plisko, E. A. (1964). Synthesis of cellulose ethers. 193-203 (Russisch). In: *Chemical Abstracts* (1966) 64, 6881 h.
- Dautzenberg, H., Loth, F., Pommerening, K., Linow, K.-J. und Bartesch, D. (1983). Mikrokapseln und Verfahren zu ihrer Herstellung. *Patentschrift der DDR* Nr. 160 393.
- Dautzenberg, H., Loth, F., Fechner, K., Mehlis, B. und Pommerening, K. (1985). Preparation and performance of symplex capsules. *Makromolekulare Chemie, Supplement* 9, 203-210.
- Dautzenberg, H., Loth, F., Pommerening, K., Linow, K.-J. und Bartesch, D. (1987). Mikrokapseln und Verfahren zu ihrer Herstellung. *Schweizerische Patentschrift* Nr. CH-659,591 A5.

- Dautzenberg, H., Dautzenberg, H., Gensrich, H.-J., Gröbe, V., Hicke, H.-G. und Paul, D. (1989). Fällungsstrukturen aus Polymerlösungen für Trennmaterialien. *Acta Polymerica* 40, 3, 177-186.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J., Philipp, B., Seidel, Ch. und Stscherbina, D. (1994). *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Hanser Verlag, München.
- Dautzenberg, H., Stange, J., Mitzner, S. und Lukanoff, B. (1996). Encapsulation by polyelectrolyte complex formation – a way to make hepatocyte cultures safe, efficient and on-line available. In: Wijffels, R. H., Buitelaar, R. M., Bucke, C. und Tramper, J. (Hrsg.). *Progress in Biotechnology Volume 11 - Immobilized Cells: Basics and Applications*. Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, 181-188.
- Dautzenberg, H., Loth, F., Pommerening, K., Linow, K.-J. und Bartsch, D. (1998). Mikrokapseln und Verfahren zu ihrer Herstellung. Deutsche Patentschrift Nr. DE 33 06 259 C 2.
- Davies, K. G. (1998). Natural parasites and biological control. In: Sharma, S. B. (Hrsg.). *The cyst nematodes*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 367-387.
- Decker, H. (1969). *Phytonematologie – Biologie und Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- de Haan, J. (1989). Nematoden biologisch bekämpfen? *Pflanzenschutz-Praxis* 1, 10-13.
- Dellweg, H. (1987). *Biotechnologie: Grundlagen und Verfahren*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Deul, H. und Solms, J. (1951). Über die Elektrolytkoagulation von wasserlöslichen Polysacchariden und anderen Hochpolymeren. *Kolloid-Zeitschrift* 124, 2, 65-69.
- Deul, H., Solms, J. und Denzler, A. (1953). Flockungsreaktionen zwischen polymeren Säuren und polymeren Basen. *Helvetica Chimica Acta* 36, 206, 1671-1680.
- Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., Harder, W. und Nordbring-Hertz, B. (1994). Nematophagous fungi: Physiological aspects and structure-function relationships. In: Rose, A. H. und Tempest, D. W. (Hrsg.). *Advances in microbial physiology*, Volume 36. Academic Press, London, Großbritannien.
- Dowe, A. (1987). Räuberische Pilze. *Die Neue Brehm-Bücherei* 449. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
- Dowler, W. M. und van Gundy, S. D. (1984). Importance of Agricultural Plant Nematology. In: Nickle, W. R. (Hrsg.). *Plant and Insect Nematodes*. Marcel Dekker, New York, USA, 1-12.

- Dürschner, U. (1983). Pilzliche Endoparasiten an beweglichen Nematodenstadien. Dissertation Universität Hannover.
- Dürschner, U. und Weischer, B. (1983). Parasiten beweglicher Nematoden im Boden: Nachweise endoparasitärer Nematodenpilze in der Bundesrepublik Deutschland. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 35, 181-183.
- Dulieu, C., Poncelet, D. und Neufeld, R. J. (1999). Encapsulation and Immobilization Techniques. In: Kühnreiter, W. M., Lanza, R. P. und Chick, W. L. (Hrsg.). Cell Encapsulation Technology and Therapeutics. Birkhäuser, Boston, USA, 1, 3-17.
- Eberle, A. (1997). Sicherheitsfermentation mit mikroverkapselten Systemen. Fortschritt-Berichte VDI Reihe 17 Nr. 156. VDI Verlag, Düsseldorf.
- Einsele, A., Finn, R. K. und Samhaber, W. (1985). Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik: Eine Einführung. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Engelberth, R. (1997). Biologische Schädlingsbekämpfung. Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (aid) e.V. (Hrsg.). Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster.
- Falbe, J. und Regitz, M. (1995). Römpf Chemie Lexikon. Sub verbum „Immobilisierung“. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Fichtner, E. (1985). Untersuchungen zur Ableitung einer Temperatursummen-Methode für die Überwachung von *Heterodera schachtii* Schmidt 1871 in Zuckerrübenfruchtfolgen. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 21, 31-40.
- Fichtner, E. (1986). Einfluß von Textur, Gehalt an organischer Substanz, Dichte und Luftgehalt des Bodens auf die Vermehrung von *Heterodera schachtii* Schmidt 1871 an Zuckerrüben. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 22, 343-350.
- Förster, M., Mansfield, J., Schellenberger, A. und Dautzenberg, H. (1994). Immobilization of citrate-producing *Yarrowia lipolytica* cells in polyelectrolyte complex capsules. Enzyme and Microbial Technology 16, 777-783.
- Fravel, D. R., Connick, W. J. Jr. und Lewis, J. A. (1998). Formulation of microorganisms to control plant diseases. In: Burges, H. D. (Hrsg.). Formulation of Microbial Biopesticides – Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, Kapitel 5, 187-202.
- Freye, H.-A. (1984). Zoologie. Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt/Main.
- Friedl, C. (1998). Pestizide auf dem Acker schaden viel und nutzen wenig. VDI Nachrichten vom 06.02.1998.

- Fugmann, B., Lieb, V., Moeschler, H. Naumann, K. und Wachendorff, U. (1991). Natürliche Pflanzenschutzwirkstoffe, Teil I: Eine Alternative zu synthetischen Pflanzenschutzmitteln? *Chemie in unserer Zeit* 25, 6, 317-330.
- Fugmann, B., Lieb, V., Moeschler, H. Naumann, K. und Wachendorff, U. (1992). Natürliche Pflanzenschutzwirkstoffe, Teil II: Grenzen der praktischen Verwertung. *Chemie in unserer Zeit* 26, 1, 35-41.
- Fuoss, R. M. und Sadek, H. (1949). Technical paper - mutual interaction of polyelectrolytes. *Science* 110, 552-554.
- Geisler, G. (1983). Ertragsphysiologie von Kulturarten des gemäßigten Klimas. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Gershenovich, A. I., Rabinovich, M. A., Kirillova, G. G., Nevolin, , F. V., Tipiseva, T. G. und Yushkevich, A. V. (1967). Antiresorption additive for washing media. Izobret., Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki 44, 19, 107, (Russ.). In: Chemical Abstracts (1968) 68, 88422 b.
- Gershenovich, A. I., Rabinovich, M. A., Kirillova, G. G. und Korzhov, V. D. (1969). Preparation of cellulose sodiosulfoethyl ether – a new antiresorption additive in detergents. *Khim. Prom.* 45, 8, 575-577, (Russ.). In: Chemical Abstracts (1970) 72, 22724 c.
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. und Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature* 285, 66.
- Good, J. M. (1968). Assessment of crop losses caused by nematodes in the United States. *FAO Plant Protection Bulletin* 16, 37-40.
- Goosen, M. F. A. und Sun, A. M. (1985). Optimization of Microencapsulation Parameters: Semipermeable Microcapsules as a Bioartificial Pancreas. *Biotechnology and Bioengineering* 27, 146-150.
- Gorman, C. (1992). Fighting bugs with bugs. *Time International* 139, 24, 43.
- Gray, N. F. (1988). Fungi attacking vermiform nematodes. In: Poinar, G. O. Jr. und Jansson, H. B. (Hrsg.). *Diseases of Nematodes. Volume II.* CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Green, J. L. und Angell, C. A. (1989). Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *The Journal of Physical Chemistry* 93, 8, 2880-2882.
- Grunewaldt-Stöcker, G. (1990). Integrierter Pflanzenbau: Biologischer Pflanzenschutz in der Bundesrepublik Deutschland – Eine Bestandsaufnahme und Bewertung von Forschungs- und Entwicklungsprojekten mit Empfehlungen für weitere Forschungsplanungen. Förderungsgemeinschaft Integrierter Pflanzenbau e. V. (FIP) (Hrsg.), Poppelsdorfer Allee 58, Bonn. Rheinischer Landwirtschafts-Verlag, Bonn.



- Gutberlet, V. (2000). Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung der pflanzenparasitären Nematoden *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871 und *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 durch Verkapselung des nematophagen Pilzes *Hirsutella rhossiliensis* Minter & Brady, 1980 unter Einsatz der nachwachsenden Rohstoffe Sulfoethylcellulose und Maiskleber. Dissertation Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Hague, N. G. M. und Gowen, S. R. (1987). Chemical control of nematodes. In: Brown, R. H. und Kerry, B. R. (Hrsg.). Principles and practice of nematode control in crops. Academic Press, London, Großbritannien, 131-178.
- Hartmann, J., Phillipp, B., Dautzenberg, H., Tiersch, B. und Purz, H. J. (1987). Morphologische Untersuchungen an Polymergelen und zum Sol-Gel-Übergang mittels Gefrierätzung. Acta Polymerica 38, 4, 203-211.
- Hartmeier, W. (1986). Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hartwig, E. E. und Epps, J. M. (1978). Registration of Bedford Soybeans. Crop Science 18, 915.
- Hari, P. R., Chandy, T. und Sharma, C. P. (1996 a). Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin. Journal of Applied Polymer Science 59, 1795-1801.
- Hari, P. R., Chandy, T. und Sharma, C. P. (1996 b). Chitosan/calcium-alginate microspheres for intestinal delivery of nitrofurantoin. Journal of Microcapsulation 13, 3, 319-329.
- Hashem, M. H. (1988). Untersuchungen zur Wirtsspezifität und zum Entwicklungszyklus endoparasitärer Nematodenpilze an beweglichen Nematoden. Dissertation Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Hayes, W. A. und Blackburn, F. (1966 a). Studies on the nutrition of *Arthrobotrys oligospora* Fes. and *A. robusta* Dudd. I. The saprophytic phase. Annales of Applied Biology 58, 43-50.
- Hayes, W. A. und Blackburn, F. (1966 b). Studies on the nutrition of *Arthrobotrys oligospora* Fes. and *A. robusta* Dudd. II. The predaceous phase. Annales of Applied Biology 58, 51-60.
- Hege, H. und Roß, H. (1972). Das Dämpfen von Böden und Erden. KTBL-Schriften-Vertrieb im Landwirtschaftsverlag, Hiltrup/Westfalen Nr. 153.
- Heijnen, C. E., Hok-A-Hin, C. H. und van Veen, J. A. (1992). Improvements to the use of bentonite clay as a protective agent, increasing survival levels of bacteria introduced into soil. Soil Biology and Biochemistry 24, 6, 533-538.
- Heinicke, D. (1990). Rübennematoden integriert bekämpfen. Pflanzenschutz-Praxis 1, 31-33.

- Heinrichs, C. (1998). Zwischenfruchtanbau: Biologische Nematodenbekämpfung erfolgversprechend? Zuckerrübe 47, 4, 204-205.
- Herzog, D., Balser, K. und Szablikowski, K. (Wolff Walsrode AG) (1989). Preparation of sulfoethyl cellulose with good solution properties. Europäische Patentschrift Nr. EP 319,867.
- Himmelmann, W., Buschmann, H. T., Herzog, D., Balser, K. und Szablikowski, K. (Agfa-Gevaert AG) (1990). Photographic material with hardener layer. Deutsche Offenlegungsschrift Nr. DE 3,914,947.
- Hijner, J. A. (1952). Devgevoeligheid van wildevbieten voor het bietencystenaaltje (*Heterodera schachtii*). Mededling Instituut voor Rationele Suikerproductie, Bergen op Zoom, 21, 1-13.
- Hoffmann, P., Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig (1999). Persönliche Mitteilung.
- Hoffmann-La Roche & Co. AG (1943). 2-Sulfoethylcellulose polysulfat. Schweizerische Patentschrift Nr. CH 229,984.
- Hoffmann, G. M., Niehaus, F., Poehling, H. M., Schönbeck, F., Weltzien, H. C. und Wilbert, H. (1994). Lehrbuch der Phytomedizin. Blackwell Wissenschaftsverlag Berlin, 3. Auflage.
- Hori, Y., Nishimura, Y. und Takahashi, F. (1985). Fluid composition for drilling. US Patent Nr. US 4,519,923.
- Industrieverband Agrar e.V. (1999 a). Kompakt 6: Zahlen, Daten, Fakten. Industrieverband Agrar e.V. (IVA), Karlstr. 21, D – 60329 Frankfurt.
- Industrieverband Agrar e.V. (1999 b). Kompakt 10: Pflanzenschutzmittel – amtlich geprüft und zugelassen. Industrieverband Agrar e.V. (IVA), Karlstr. 21, D – 60329 Frankfurt.
- Irvine, T.S. (1990). Laboratory Fermenters. In: McNeil, B. und Harvey, L.M. (Hrsg.). Fermentation. Oxford University Press, Oxford, Großbritannien.
- Jaffee, B. A. (1992). Population biology and biological control of nematodes. Canadian Journal of Microbiology 38, 359-364.
- Jaffee, B. A. (1999). Enchytraeids and nematophagous fungi in tomato fields and vineyards. Phytopathology 89, 398-406.
- Jaffee, B. A. (2000). Augmentation of soil with the nematophagous fungi *Hirsutella rhossiliensis* and *Arthrobotrys haptotyla*. Phytopathology 90, 498-504.
- Jaffee, B. A. und Muldoon, A. E. (1989). Suppression of cyst nematode by natural infestation of a nematophagous fungus. Journal of Nematology 21, 505-510.

- Jaffee, B. A. und Muldoon, A. E. (1995). Numerical responses of the nematophagous fungi *Hirsutella rhossiliensis*, *Monacrosporium cionopagum* and *M. ellipsosporum*. *Mycologia* 87, 643-650.
- Jaffee, B. A. und Muldoon, A. E. (1997). Suppression of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by alginate pellets containing the nematophagous fungi *Hirsutella rhossiliensis*, *Monacrosporium cionopagum* and *M. ellipsosporum*. *Biocontrol Science and Technology* 7, 203-217.
- Jaffee, B. A. und Zehr, E. I. (1982). Parasitism of the nematode *Circonemella xenoplax* by the fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Phytopathology* 72, 1378-1381.
- Jaffee, B. A. und Zehr, E. I. (1983). Effects of certain solutes, osmotic potential, and soil solutions on parasitism of *Circonemella xenoplax* by *Hirsutella rhossiliensis*. *Phytopathology* 73, 544-546.
- Jaffee, B. A. und Zehr, E. I. (1985). Parasitic and saprophytic abilities of the nematode-attacking fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Journal of Nematology* 17, 341-345.
- Jaffee, B. A., Gaspard, J. T. und Ferris, H. (1989). Density-dependent parasitism of the soil-borne nematode *Circonemella xenoplax* by the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Microbial Ecology* 17, 193-200.
- Jaffee, B. A., Muldoon, A. E., Phillips, R. und Mangel, M. (1990). Rates of spore transmission, mortality, and production for the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Phytopathology* 80, 1083-1088.
- Jaffee, B. A., Abawi, G. S., Muldoon, A. E. und Westerdahl, B. B. (1995). Efficacy of pelletized hyphae of *Hirsutella rhossiliensis* against *Heterodera schachtii* in field microplots. *Journal of Nematology* 27, 4, 504.
- Jaffee, B. A., Muldoon, A. E. und Westerdahl, B. B. (1996). Failure of a mycelial formulation of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* to suppress the nematode *Heterodera schachtii*. *Biological Control* 6, 340-346.
- Jansson, H. B. und Nordbring-Hertz, B. (1988). Infection events in the fungus-nematode system. In: Poinar, G. O. Jr. und Jansson, H. B. (Hrsg.). *Diseases of Nematodes, Volume II*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Jatala, P. (1986). Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 24, 453-489.
- Jekel, M., Buhr, A., Willke, T. und Vorlop, K.-D. (1998). Immobilization of biocatalysts in LentiKats<sup>®</sup>. *Chemical Engineering & Technology* 21, 275-278.
- Johnson, A. W. und Feldmesser, J. (1987). Nematicides – a historical review. In: Vech, J. A. und Dickson, D. W. (Hrsg.). *Visitas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville, 448-454.

- Jolles, P. (1963). Chromatography of peptides on ion-exchange columns of resins and celluloses. *Bulletin of the Chemical Society of France* 12, 2923-2932.
- Jones, R. L. und Black, R. C. (1983). Monitoring aldicarb residues in Florida soil and water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2, 269-281.
- Jones, K. A. und Burges, H. D. (1998). Technology of formulation and application. In: Burges, H. D. (Hrsg.). *Formulation of microbial biopesticides – Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Jung, C. (1997). Identifizierung eines Resistenzgens zum Schutz von Zuckerrüben gegen Fadenwürmer. *Spektrum der Wissenschaft* 11, 14-16.
- Jung, G. (1998). Züchterischer Durchbruch erzielt. *Zuckerrübe* 47, 1, 39.
- Jung, C. und Wyss, U. (1999). New approaches to control plant parasitic nematodes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 439-446.
- Kabanov, V. A. (1992). Interpolyelectrolyte gels: properties, stucture, perspectives. *Polymer Materials, Science and Engineering* 66, 9-10.
- Kas, S. H. (1997). Chitosan: properties, preparations and application to micro-particulate systems. *Journal of Microcapsulation* 14, 6, 689-711.
- Kerry, B. R. (1980). Biocontrol: Fungal Parasites of Female Cyst Nematodes. *Journal of Nematology* 12, 253-259.
- Kerry, B. R. (1987). Biological control. In: Brown, R. H. und Kerry, B. R. (Hrsg.). *Principles and practice of nematode control in crops*. Academic Press, London, Großbritannien.
- Kerry, B. R. (1988). Fungal Parasites of Cyst Nematodes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 24, 293-305.
- Kerry, B. R. (1989). Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. In: Whipps, J. M. und Lumsden, R. D. (Hrsg.). *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Cambridge University Press, Cambridge, Großbritannien.
- Kerry, B. R. (1990 a). Selection of exploitable control agents for plant-parasitic nematodes. *Aspects of Applied Biology* 24, 1-9.
- Kerry, B. R. (1990 b). An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. *Supplement to Journal of Nematology* 22, 621-631.
- Kerry, B. R. (1993). The use of microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes. In: Jones, D. G. (Hrsg.). *Exploitation of Microorganisms*. Chapman & Hall, London, Großbritannien.

- Kerry, B. R. (1995). New Strategies for the Management of Plant Parasitic Nematodes with especial emphasis on Biological Control. Arab Journal of Plant Protection 13, 1, 47-52.
- Kerry, B. R. (1997). Biological control of nematodes: Prospects and opportunities. In: Food and Agriculture Organization (FAO) (Hrsg.). Plant Production and Protection Paper No. 144, 79-92.
- Kerry, B. R. (1998). Progress towards biological control strategies for plant-parasitic nematodes. The 1998 Brighthelm Conference – Pests & Diseases. Conference Proceeding 3, 739-746.
- Kerry, B. R. und Evans, K. (1996). New strategies for the management of plant parasitic nematodes. In: Hall, R. (Hrsg.). Principles and Practice of managing soilborne plant pathogens. The American Phytopathological Society, St. Paul, USA.
- Kerry, B. R. und Jaffee, B. A. (1997). Fungi as Biological Control Agents for Plant Parasitic Nematodes. In: Esser, K. und Lemke, P. A. (Hrsg.). The Mycota IV – A Comprehensive Treatise. Springer, Berlin und Heidelberg.
- Kerry, B. R. und Hominick, W. M. (1999). Biological Control. In: Lee, D. L. (Hrsg.). Biology of Nematodes. Harwood Academic Publishers, London, Großbritannien.
- Kerry, B. R., Kirkwood, I. A., Leij, de F. A. A. M., Leijdens, M. B. und Brookes, P. C. (1993). Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. Biocontrol Science and Technology 3, 335-365.
- Kessel, W. C. (1977). Können wir mit Nematoden leben ? Die Zuckerrübe 1, 10-13.
- Kessel, W. C. (1979). 3jährige Erfahrungen mit der Bodenentseuchung bei Befall mit dem zystenbildenden Rübennematoden *Heterodera schachtii*. Die Zuckerrübe 28, 4, 8-13.
- Khare, A. R. und Peppas, N. A. (1995). Swelling/deswelling of anionic copolymer gels. Biomaterials 16, 559-567.
- Kikugawa, K. und Minoshima, K. (1978). Removal of leukocytes und platelets from blood. Yakugaku Zasshi 98, 4, 489-494.
- Kim, S., Choi, J. H., Balmaceda, E. A. und Rha, C. K. (1999). Chitosan. In: Kühtreiber, W. M., Lanza, R. P. und Chick, W. L. (Hrsg.). Cell Encapsulation Technology and Therapeutics. Birkhäuser, Boston, USA, 13, 151-172.
- Klein, J. und Vorlop, K.-D. (1985). Immobilization techniques. In: Moo-Young, M. (Hrsg.). Cells in comprehensive bio-technology. Pergamon Press, Oxford, Vol. II, 203-224.
- Kleine, M., Cai, D., Klein-Lankhorst, R. M., Sandal, N. N., Salentijn, E. M. J., Harloff, H., Kifle, S., Marcker, K. A., Stiekema, W. J. und Jung, C. (1997). Breeding for

nematode resistance in sugarbeet: A molecular approach. Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions 176-190.

Kleespies, R. G. und Zimmermann, G. (1998). Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarrhizium anisopliae*. Biocontrol Science Technology 8, 2, 207-214.

Knorr, D. und Daly, M. (1988). Mechanics and diffusional changes observed in multi-layer chitosan/alginate coacervate capsules. Process Biochemistry 23, 48-50.

Knorr, D. (1991). Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. Food Technology 1, 114-122.

König, K. H. (1990 a). Fortschritte im chemischen Pflanzenschutz, Teil I: Neue Erkenntnisse erfordern neue Zielsetzungen am Beispiel der Herbizide. Chemie in unserer Zeit 5, 217-226.

König, K. H. (1990 b). Fortschritte im chemischen Pflanzenschutz, Teil II: Neue Breitbandfungizide, Bioregulatoren, Pheromone. Chemie in unserer 6, 292-302.

Krieg, A. und Franz, J. M. (1989). Lehrbuch der biologischen Schädlingsbekämpfung. Verlag Paul Parey, Berlin.

Kudela, V., Richau, K., Schwarz, H.-H. und Paul, D. (1992). Electrochemical behaviour of polyelectrolyte complex membranes. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 57, 2145-2150.

Kühn, J. (1881). Bericht über die Ergebnisse der im Auftrage des Vereins für Rübenzuckerindustrie des Deutschen Reiches ausgeführten Versuche zur Ermittlung der Ursache der Rübenmüdigkeit des Bodens und zur Erforschung der Natur der Nematoden. Berichte aus dem Physiologischen Laboratorium und der Versuchsanstalt des landwirtschaftlichen Instituts der Universität Halle 3.

Kühn, J. (1882). Die Wirksamkeit der Nematoden-Fangpflanzen nach den Versuchsergebnissen des Jahres 1881. Berichte aus dem Physiologischen Laboratorium und der Versuchsanstalt des landwirtschaftlichen Instituts der Universität Halle 4, 1-14.

Kühtreiber, W. M., Lanza, R. P. und Chick, W. L. (1999). Cell Encapsulation Technology and Therapeutics. Birkhäuser, Boston, USA.

Kunz, M., Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurt (2000). Persönliche Mitteilung.

KWS Kleinwanzlebener Saatzucht AG (1999 a). Zuckerrüben von KWS: Ein starkes Stück: Qualität von KWS. Informationsschrift KWS Kleinwanzlebener Saatzucht AG, Grimsehlstraße 31, D – 37555 Einbeck.

KWS Kleinwanzlebener Saatzucht AG (1999 b). Zuckerrüben von KWS: Keine Angst vor Nematoden. Informationsschrift KWS Kleinwanzlebener Saatzucht AG, Grimsehlstraße 31, D – 37555 Einbeck.

- Lackey, B. A., Jaffee, B. A. und Muldoon, A. E. (1992). Sporulation of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* from hyphae produced in vitro and added to soil. *Phytopathology* 82, 1326-1330.
- Lackey, B. A., Muldoon, A. E. und Jaffee, B. A. (1993). Alginate pellet formulation of *Hirsutella rhossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. *Biological Control* 3, 155-160.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H. und Crowe, L. M. (1995). *Applied and Environmental Microbiology* 10, 3592-3597.
- Lide, D. R. (1992). *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 73. Auflage 1992-1993, 15,20.
- Liebscher, G. (1878). Die Rübenmüdigkeit des Ackers hervorgerufen durch *Heterodera schachtii*. *Zeitschrift des Vereins für die Rübenzuckerindustrie im Zollverein* 28, 893-895.
- Lieverse, L. C. und van't Riet, K. (1994). Convective drying of bacteria. In: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Volume 50. Springer Verlag, Heidelberg, 45-63.
- Lim, F. (1979 a). Encapsulation of viable tissue. *Britische Patentschrift* GB 2 119 737 A.
- Lim, F. (1979 b). Encapsulation of chemically active, biologically active materials and viable tissue. *Britische Patentschrift* GB 2 046 209 A.
- Lim, F. (1982 a). Encapsulation of biological material. *United States Patentschrift* 4,352,883.
- Lim, F. (1982 b). Process and system for producing biological materials from encapsulated cells. *Britische Patentschrift* GB 2 094 833 A.
- Lim, F. (1984). Microencapsulation of living cells and tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 10, 81-85.
- Lim, F. und Sun, A. M. (1980). Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210, 908-910.
- Lim, F. und Moss, R. D. (1981). Microencapsulation of Living Cells and Tissues. *Journal of Pharmaceutical Science* 70, 4, 351-357.
- Lin, S.-Y. und Lin, P.-C. (1992). Effect of acid type, acetic acid and sodium carboxymethyl cellulose concentrations on the formation, micrometric, dissolution and floating properties of theophylline chitosan microcapsules. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40, 9, 2491-2497.

- Lloyd-Evans, L. P. M. und Barfoot, P. (1996). EU boasts good science base and economic prospects for crop biotechnology. *Genetic Engineering News* 7, 16.
- Lohmann, U. (1989). Untersuchungen zur Biologie und Anwendung der endoparasitären Pilze *Verticillium balanoides* Dowsett und *Drechmeria coniospora* Gams und Jansson zur biologischen Bekämpfung von pflanzenparasitären Nematoden. Dissertation Universität Bonn.
- Loth, F. (1997). Verfahren zur Herstellung von Chitosan. Deutsche Patentschrift Nr. DE 19530689 A1.
- Luc, M, Sikora, R. A. und Bridge, J. (1990). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford, Großbritannien.
- Lysek, G. und Nordbring-Hertz, B. (1983). Die Biologie nematodenfangender Pilze. *Forum Mikrobiologie* 6, 201-208.
- McInnis, T. M. und Jaffee, B. A. (1989). An assay for *Hirsutella rhossiliensis* spores and the importance of phialides for nematode inoculation. *Journal of Nematology* 21, 229-234.
- MacLeod, D. M. (1959 a). Nutritional studies on the genus *Hirsutella*, I. Growth response in an enriched liquid medium. *Canadian Journal of Botany*, 37, 695-714.
- MacLeod, D. M. (1959 b). Nutritional studies on the genus *Hirsutella*, II. Nitrogen utilization in a synthetic medium. *Canadian Journal of Botany*, 37, 819-834.
- Mankau, R. (1980 a). Biocontrol: Fungi as Nematode Control Agents. *Journal of Nematology* 12, 244-252.
- Mankau, R. (1980 b). Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annual Review of Phytopathology* 18, 415-440.
- Meinert, G. und Mittnacht, A. (1992). Integrierter Pflanzenschutz: Unkräuter, Krankheiten und Schädlinge im Ackerbau. Ulmer Fachbuch Ackerbau, Stuttgart.
- Michaels, A. S. und Miekka, R. G. (1961). Polycation-polyanion complexes: preparation and properties of poly-(vinylbenzyltrimethylammonium) poly-(styrenesulfonate). *The Journal of Physical Chemistry* 65, 5, 1765-1773.
- Michaels, A. S. (1965). Polyelectrolyte complexes. *Industrial and Engineering Chemistry* 27, 10, 32-40.
- Michaels, A. S., Mir, L. und Schneider, N. S. (1965). A conductometric study of polycation-polyanion reactions in dilute aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry* 69, 5, 1447-1455.
- Mier, W. und Roth, R. (1997). Lektine: Schlüsselmoleküle in der Protein-Saccharid-Erkennung. *Bioforum* 7/8, 362-366.



- Minter, D. W. und Brady, B. L. (1980). Mononematous species *Hirsutella*. Transactions of the British Mycological Society 74, 271-282.
- Müller, J. (1985). The influence of two pesticides on fungal parasites of *Heterodera schachtii*. Les Colloques de l'INRA 31, 225-231.
- Müller, J. (1992). Detection of pathotypes by assessing the virulence of *Heterodera schachtii* populations. Nematologica 38, 50-64.
- Müller, J. (1998). Resistenz und Toleranz gegen Rüben nematoden (*Heterodera schachtii*) in Zuckerrübensorten. Zuckerindustrie 123, 9, 688-693.
- Müller, J. und Zimmermann, G. (1985). Versuche zur Bekämpfung von Wurzelgal lenälchen (*Meloidogyne incognita*) mit dem nematodenfangenden Pilz *Arthro botrys irregularis*. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, Braunschweig 37, 91.
- Müller, J. und Steudel, W. (1982). Die Abundanzdynamik von *Heterodera schachtii* an Ölrettich (*Raphanus sativus* L.) unter verschiedenen Umweltbedingungen. Zuckerindustrie 107, 12, 1120-1123.
- Muscat, A., Prüße, U. und Vorlop, K.-D. (1996). Stable support materials for the immobilization of viable cells. In: Wijffels, R. H., Buitelaar, R. M., Bucke, C. und Tramper, J. (Hrsg.). Progress in Biotechnology Volume 11 - Immobilized Cells: Basics and Applications. Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, 55-69.
- Muzzarelli, R. A. A. (1977). Chitin. Pergamon Press, Oxford, Großbritannien.
- Muzzarelli, R. A. A. (1990). Chemical resistant polymers. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering 3, 430-441.
- Nelson, J. M. und Griffin, E. G. (1916). Adsorption of Invertase. Journal of the American Chemical Society 38, 1109-1115.
- Nemec, B. (1910). Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen. VI. Vielkernige Riesenzellen in *Heterodera* Gallen. Gebrüder Borntrager, Berlin, 151-173.
- Nemec, B. (1911). Über die Nematodenkrankheit der Zuckerrübe. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten 21, 1-10.
- Nemec, B. (1933). Über die Gallen von *Heterodera schachtii* auf der Zuckerrübe. Memoires de la Societe Royale des Lettres et des Sciences de Bohême 9, 1-14.
- Nickle, W. R. (1984). Plant and Insect Nematodes. Marcel Dekker, New York, USA.
- Nokka-Tume OY (1999). Combined fertilizer & seeds drills. Firmenprospekt Nokka-Tume OY, P. O. Box 77, Fi - 14201 Turenki, Finnland.

- Nordbring-Hertz, B. (1988). Nematophagous fungi: Strategies for nematode exploitation and for survival. *Microbiological Sciences* 5, 108-116.
- Oerke, E.-C., Dehne, H.-W., Schönbeck, F. und Weber, A. (1994). Crop production and crop protection - estimated losses in major food and cash crops. Elsevier, Amsterdam, Niederlande.
- Ohstubo, T. und Tsuji, K. (1999). Insecticide microcapsules: Design-efficacy relationship. In: Arshady, R. (Hrsg.). *Microspheres, microcapsules & liposomes*. Vol. 1: Preparation & chemical applications. Citus Books, London, Großbritannien, 3, 13, 373-388.
- Okhamafe, A. O., Amsden, B., Chu, W. und Goosen, M. F. A. (1996). Modulation of protein release from chitosan-alginate microcapsules using the pH-sensitiv polymer hydroxylpropyl methylcellulose acetate succinate. *Journal of Microcapsulation* 13, 5, 497-508.
- Pandya, Y. und Knorr, D. (1991). Diffusion characteristics and properties of chitosan coacervate capsules. *Process Biochemistry* 26, 75-81.
- Patel, A. V. (1998). Verkapselungsverfahren für die biologische Schädlingsbekämpfung und zur Konstruktion von „vegetativen“ Samen. Dissertation Technische Universität Carolo Wilhelmina Braunschweig.
- Peoples, S. A., Maddy, K. T., Cosick, W. Jackson, T. Cooper, C. und Frederickson, A. S. (1980). A study of samples of well water collected from selected areas in California to determine the presence of DBCP and certain other pesticide residues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 24, 611-618.
- Peppas, N. A. und Khare, A. R. (1993). Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews* 11, 1-35.
- Pflanzenschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland (1998). *Bundesgesetzblatt I* vom 14. Mai 1998, 971, 1527.
- Pflüger, W. (1998). Entwicklung und Anwendung von Pflanzenschutzmitteln: Wirtschaftliche Aspekte. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 10, 4, 254-256.
- Philipp, B., Hong, L. T., Dawydoff, W. und Linow, K.-J. (1979). Über Symplexe von Cellulosederivaten. 6. Mitt. Untersuchungen zur Stöchiometrie der Fällungen von Carboxymethylcellulose und Cellulosesulfat mit polymeren Kationen. *Acta Polymerica* 30, 9, 563-568.
- Philipp, B., Hong, L. T., Linow, K.-J., Dawydoff, W. und Arnold, K. (1980). Über Symplexe von Cellulosederivaten. 8. Mitt. Untersuchungen zur Wasserquellung unterschiedlicher Symplexfällungen. *Acta Polymerica* 31, 10, 654-658.

- Philipp, B., Dawydoff, W. und Linow, K.-J. (1982). Polyelektrolytkomplexe - Bindungsweise, Strukturen und Anwendungsmöglichkeiten. *Zeitung für Chemie* 22, 1, 1-13.
- Pirt, S. J. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Großbritannien.
- Pletnev, M. Yu., Trapeznikoy, A. A. und Reznikov, I. G. (1980). Foaming composition for fire extinguishing of hydrophilic liquids. *Otkrytiya, Izobret., Prom. Obratsy, Tovarnye Znaki* 17, 19, (Russ.). In: *Chemical Abstracts* (1980) 93, 132, 93: 188672 t.
- Plisko, E. A., Kiselev, G. P. und Skvirskii, L. Ya. (1974). Synthesis and study of the depressing action of water-soluble cellulose ethers during the flotation beneficiation of sylvinitic ores. *Zhurnal Prikladnoi Khimii* (Journal of Applied Chemistry of the USSR) 47, 6, 1430-1433, (Russ.). In: *Chemical Abstracts* (1975) 82, 143, 19019 c.
- Polk, A., Amsden, B., De Yao, K., Peng, T. und Goosen, M. F. A. (1984). Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83, 2, 178-185.
- Pommering, K., Ristau, O., Rein, H. Dautzenberg, H. und Loth, F. (1983). Immobilisierung von Proteinen und Zellfragmenten durch ein neues Verfahren der Mikrokapsulierung. *Biomedical Biochim. Acta* 42, 7/8, 813-823.
- Poncelet, D. und Neufeld, R. J. (1996). Fundamentals of dispersion in encapsulation technology. In: Wijffels, R. H., Buitelaar, R. M., Bucke, C. und Tramper, J. (Hrsg.). *Progress in Biotechnology Volume 11 - Immobilized Cells: Basics and Applications*. Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, 47-54.
- Posillico, E. G. (1986). Microencapsulation technology for large-scale antibody production. *Bio/Technology* 4, 2, 114-117.
- Potts, M. (1994). Dessication tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews* 12, 755-805.
- Preusse, T. (2000). Taxes on pesticides? *Agrifuture* 1, 14-15.
- Prokop, A., Hunkeler, D., Dimari, S., Haralson, M. A. und Wang, T. G. (1998 a). Water soluble polymers for immunoisolation I: Complex coacervation and cytotoxicity. *Advances in Polymer Science* 136, 1-51.
- Prokop, A., Hunkeler, D., Powers, A. C., Whitesell, R. R. und Wang, T. G. (1998 b). Water soluble polymers for immunoisolation II: Evaluation of multicomponent microcapsulation systems. *Advances in Polymer Science* 136, 53-73.
- Prüße, U., Fox, B., Kirchhoff, M., Bruske, F., Breford, J. und Vorlop, K.-D. (1998 a). New process (Jet Cutting Method) for the production of spherical beads from highly viscous polymer solutions. *Chemical Engineering & Technology* 21, 1, 29-33.

- Prüße, U., Fox, B., Kirchhoff, M., Bruske, F., Breford, J. und Vorlop, K.-D. (1998 b). Improvement of the Jet Cutting Method for the preparation of spherical particles from viscous polymer solutions. *Chemical Engineering & Technology* 21, 2, 153-157.
- Prüße, U. (1999). Entwicklung, Charakterisierung und Einsatz von Edelmetallkatalysatoren zur Nitratreduktion mit Wasserstoff und Ameisensäure sowie des Strahlschneider-Verfahrens zur Herstellung Polyvinylalkohol-verkapselter Katalysatoren. Dissertation Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig.
- Raski, D. J. (1949). The life history and morphology of the sugar beet nematode, *Heterodera schachtii*. *Phytopathology* 40, 135-152.
- Raski, D. J., Jones, S. L., Hafez, J. J., Kissler, J. J. und Luvisi, D. A. (1981). Systemic nematicides tested as alternatives to DBCP. *California Agriculture* 05/06, 35, 10-12.
- Rees, D. A. und Welsh, E. J. (1977). Sekundär- und Tertiärstruktur von Polysacchariden in Lösung und in Gelen. *Angewandte Chemie* 89, 228-239.
- Rieckmann, W. und Steck, U. (1995). Krankheiten und Schädlinge der Zuckerrübe. Verlag Thomas Mann, Gelsenkirchen, 162-165.
- Riggs, R. D. und Wrather, J. A. (1992). Biology and Management of the Soybean Cyst Nematode. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Robinson, A. F. und Jaffee, B. A. (1996). Repulsion of *Meloidogyne incognita* by Alginate Pellets containing Hyphae of *Monacrosporium cionopagum*, *M. ellipsosporum*, or *Hirsutella rhossiliensis*. *Journal of Nematology* 28, 2, 133-147.
- Roser, B. (1991). Trehalose drying: A novel replacement for freeze-drying. *BioPharm* 9, 47-53.
- Ross, J. P. und Brim, C. A. (1957). Resistance of soybeans to the soybean cyst nematode as determined by a double-row method. *Plant Disease Reporter* 41, 11, 923-924.
- Ross, J. P. und Brim, C. A. (1966). Registration of pickett soybeans. *Crop Science* 6, 305.
- Rothenburger, W. und Quarrell-Reichle, C. (1998). Ökonomische Auswirkungen der eingeschränkten Anwendung von Nematiziden im Gartenbau. Schriftenreihe des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (Hrsg.). Reihe A: Angewandte Wissenschaft Nr. 374.
- Rubner, A. und Bernitzky, A. R. (1992). Nematoden-zerstörende Pilze. *Biologie in unserer Zeit* 2, 97-103.

- Sasser, J. N. und Freckmann, D. W. (1987).** A world perspective on Nematology: The role of the Society. In: Veech, J. A. und Dickson, D. W. (Hrsg.). *Visitas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville.
- Saxena, G., Mittal, N., Mukerji, K. G. und Arora, D. K. (1991). Nematophagous fungi in the biological control of nematodes. In: Arora, D. K., Ajello, L. und Mukerji, K. G. (Hrsg.). *Handbook of Applied Mycology. Volume 2: Humans, Animals and Insects*. Marcel Dekker, New York, USA.
- Schacht, H. (1859 a). Über einige Feinde der Rübenfelder. *Zeitschrift des Vereins der Rübenzuckerindustrie im Zollverein* 9, 175-179.
- Schacht, H. (1859 b). Über einige Feinde und Krankheiten der Zuckerrübe. *Zeitschrift des Vereins der Rübenzuckerindustrie im Zollverein* 9, 239-250.
- Schäufele, W. R. (1982). *Schädlinge und Krankheiten der Zuckerrübe*. Verlag Thomas Mann, Gelsenkirchen-Buer.
- Schindler, T. und Nordmeier, E. (1994). Studies on the formation and aggregation of polyelectrolyte complexes formed between poly(styrenesulfonic acid) and poly(diallyl-N,N-dimethylammonium chloride). *Polymer Journal* 26, 10, 1124-1131.
- Schiweck, H., Munir, M., Rapp, K. M., Schneider, B. und Vogel, M. (1991). New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. In: Lichtenthaler, F. W. (Hrsg.). *Carbohydrates as organic raw materials*. Verlag Chemie, Weinheim, 57-94.
- Schiweck, H. und Munir, M. (1992). Isomalt (Palatinit), a versatile alternative sweetener – production, properties and use. In: Clarke, M. A. (Hrsg.). *Carbohydrates in industrial synthesis*. Bartens, Berlin.
- Schlang, J. (1991). Anbau resistenter Zwischenfrüchte zur biologischen Bekämpfung des Rübenzystennematoden. *Die Zuckerrübe* 40, 4, 240-244.
- Schlang, J. (1998). Mehrjährige Untersuchungen an nematodenresistenten Zuckerrüben-Hybriden. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 357, 72-75.
- Schlegel, H. G. (1985). *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schmidt, A. (1871). Über den Rübenneematoden. *Zeitschrift des Vereins der Rübenzuckerindustrie im Zollverein* 21, 1-19.
- Schmidt, A. (1872). Zweiter Bericht über den Rübenneematoden. *Zeitschrift des Vereins der Rübenzuckerindustrie im Zollverein* 22, 67-75.
- Schubert, H. (1986). Agglomerieren. In: Dialer, K., Onken, U. und Leschonski, K. (Hrsg.). *Grundzüge der Verfahrenstechnik und Reaktionstechnik*. Carl Hanser Verlag, München, 94-105.

- Schuster, R. P. und Sikora, R. A. (1992). Influence of different formulations of fungal egg pathogens in alginate granules on biological control of *Globodera pallida*. Fundam. Applied Nematology 15, 257-263.
- Scott, C. (1984). Immobilized cells: a review of recent literature. Enzyme Microbiol. Technol. 9, 66-72.
- Senuma, Y., Lowe, C., Zweifel, Y., Hilborn, J. G. und Marison, I. (2000). Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization. Biotechnology and Bioengineering 67, 5, 616-622.
- Shibatani, T. (1996). Industrial application of immobilized biocatalysts in Japan. In: Wijffels, R. H., Buitelaar, R. M., Bucke, C. und Tramper, J. (Hrsg.). Progress in Biotechnology Volume 11 - Immobilized Cells: Basics and Applications. Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, 585-591.
- Shin-Etsu Chemical Industry Co., Ltd. (1981 a). Ceramic composition for casting in gypsum molds. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 8154, 264.
- Shin-Etsu Chemical Industry Co., Ltd. (1981 b). Cosmetics containing sulfoethyl cellulose sodium salt. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 8118, 907.
- Shin-Etsu Chemical Industry Co., Ltd. (1981c). Transfer paper for decorating ceramic wares. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 8163, 486.
- Shin-Etsu Chemical Industry Co., Ltd. (1981 d). Glaze. Japanese Office Annual Report 8163, 843.
- Shin-Etsu Chemical Industry Co., Ltd. (1981 e). Sulfoethyl cellulose thickeners for latex paints. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 8172, 059.
- Shin-Etsu Chemical Industry Co., Ltd. (1982). Extrusion molding of ceramics. Japanisches Patent Nr. JP 82,100,974.
- Siddiqui, Z. A. und Mahmood, I. (1996). Biological Control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. Bioresource Technology 58, 229-239.
- Skouri, R., Schoessler, F., Munch, J. P. V. und Candau, S. J. (1995). Swelling and elastic properties of polyelektrolyte gels. Macromolecules 28, 197-210.
- Smidsrød, O. und Skjak-Bræk, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology 8, 3, 71-78.
- Spiekermann, P., Vorlop, K. D. und Klein, J. (1987). Animal Cells encapsulated within Ca-Alginate Hollow-Spheres. In: Neijssel, O. M., van der Meer, R. R. und Loyben, K. Ch. A. M. (Hrsg.). Proceedings of the 4<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Niederlande, 3, 590-593.

- Steele, A. E. (1984). Nematode Parasites of Sugar Beet. In: Nickle, W. R. (Hrsg.). Plant and Insect Nematodes. Marcel Dekker, New York, USA, 507-570.
- Stefuca, V., Gemeiner, P., Kurillova, L., Dautzenberg, H., Polakovic, M. und Bales, V. (1991). Polyelectrolyte complex capsules as a material for enzyme immobilization. Applied Biochemistry and Biotechnology 30, 313-324.
- Steudel, W. und Müller, J. (1981). Der Einfluß resistenter Ölrettichlinien auf die Abundanzdynamik von *Heterodera schachtii* Schmidt. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 33, 97-103.
- Steudel, W., Schlang, J. und Müller, J. (1985). Untersuchungen zum Einfluß einiger Zwischenfrüchte auf die Abundanzdynamik des Rüben nematoden *Heterodera schachtii* Schmidt in verschiedenen Bodentiefen. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 226, 129-140.
- Stirling, G. R. (1988 a). Biological control of plant-parasitic nematodes. In: Poinar, G. O., Jr. und Jansson, H.-B. (Hrsg.). Diseases of nematodes, Volume II. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Stirling, G. R. (1988 b). Prospects for the use of fungi in nematode control. In: Burge, M. N. (Hrsg.). Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, Großbritannien.
- Stirling, G. R. (1991). Biological Control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and prospects. CAB International Wallingford, Großbritannien.
- Stirling, G. R. (1992). Outlook for biocontrol. In: Gommers, F. J. und Maas, P. W. T. (Hrsg.). Nematology from molecule to ecosystem. European Society of Nematologists, Dundee, Großbritannien.
- Stirling, G. R. und Mani, A. (1995). The activity of nematode-trapping fungi following their encapsulation in alginate. Nematologica 41, 240-250.
- Stirling, G. R. und Smith, L. J. (1998). Field tests of formulated products containing either *Verticillium chlamydosporium* or *Arthrobotrys dactyloides* for biological control of root-knot nematodes. Biological Control 11, 231-239.
- Stirling, G. R., Licastro, K. A., West, L. M. und Smith, L. J. (1998 a). Development of commercially acceptable formulations of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. Biological Control 11, 217-223.
- Stirling, G. R., Smith, L. J., Licastro, K. A. und Eden, L. M. (1998 b). Control of root-knot nematode with formulations of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. Biological Control 11, 224-230.
- Strubell, A. (1888). Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung des Rüben nematoden *Heterodera schachtii* Schmidt. Cassel Bibliotheca Zoologica 2.

- Sturhan, D. und Schneider, R. (1980). *Hirsutella heteroderae*, ein neuer nematodenparasitärer Pilz. Phytopathologische Zeitschrift 99, 105-115.
- Sukatsch, D. und Dziengel, A. (1984). Formelsammlung Biotechnologie. Bibliomed, Melsungen.
- Takahashi, T., Takayama, K., Machida, Y. und Nagai, T. (1990). Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate. International Journal of Pharmaceutics 61, 35-41.
- Tappeser, B. (1997). Gentechnik in der Landwirtschaft: Die Risiken der Anwendung. Spektrum der Wissenschaft, Dossier Welternährung 2/1997, 92-94.
- Tedford, E. C., Jaffee, B. A. und Muldoon A. E. (1992). Effect of soil moisture on transmission of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* to cyst and root-knot nematodes. Phytopathology 82, 10, 1002-1007.
- Tedford, E. C., Jaffee, B. A. und Muldoon A. E. (1994). Variability among isolates of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. Mycological Research 98, 1127-1136.
- Tedford, E. C., Jaffee, B. A. und Muldoon A. E. (1995). Suppression of the nematode *Heterodera schachtii* by the fungus *Hirsutella rhossiliensis* as affected by fungus density and nematode movement. Phytopathology 85, 613-617.
- Thiede, H. (1988). Taschenbuch des Pflanzenarztes. Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup, 67-68.
- Thiele, H. und Micke, H. (1948). Über Strukturen in ionotropen Gelen. Kolloid-Zeitschrift 111, 2, 73-79.
- Thiele, H. (1949). Über Ionotropie. Kolloid-Zeitschrift 115, 1-3, 167-169.
- Thiele, H. und Micke, H. (1950). Über Ionotropie. Kolloid-Zeitschrift 116, 1, 1-9.
- Thiele, H. (1954). Modellversuche zur Synthese mizellarer Strukturen. Kolloid-Zeitschrift 136, 2/3, 80-84.
- Thiele, H. und Andersen, G. (1955 a). Ionotrope Gele von Polyuronsäuren: I. Bildung und Verhalten. Kolloid-Zeitschrift 140, 2/3, 76-101.
- Thiele, H. und Andersen, G. (1955 b). Ionotrope Gele von Polyuronsäuren: II. Ordnungsgrad. Kolloid-Zeitschrift 142, 1, 5-24.
- Thiele, H. und Hallich, K. (1957). Kapillarstrukturen in ionotropen Gelen. Kolloid-Zeitschrift 151, 1, 1-12.
- Thiele, H. und Hallich, K. (1958). Über ionotrope Gele mit Kapillarstruktur. Zeitung für Naturforschung 13 b, 580-588.



- Thiele, H. (1963). Ionotrope Gele - Modelle für das biologische Wachstum. Umschau 4, 117-121
- Thiele, H., Joraschky, W., Plohnke, K. Wiechen, A. Wolf, R. und Wollmer, A. (1963). Prinzip einer Strukturbildung. Ionen ordnen Fadenmoleküle. Kolloid-Zeitschrift 197, 1-2, 26-35.
- Thiele, H. und Cordes, J. (1966). Zur Theorie der Bildung von Gelen. Kolloid-Zeitschrift 216, 1, 361-370.
- Thiele, H. (1967). Prinzip einer Strukturbildung. Naturwissenschaften 54, 6, 136-139.
- Thielking, H., Wolff Walsrode AG (1998). Persönliche Mitteilung.
- Thomas, E. und Meyer, W. (1995). Biologische Nematodenbekämpfung: Einfluß der Anbauform resistenter Kruziferen gegenüber Rübennematoden und auf den Rübenenertrag. Die Zuckerrübe 44, 4, 190-194.
- Thu, B., Smidsrød, O. und Skjåk-Bræk, G. (1996). Alginate gels – some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. In: Wijffels, R. H., Buitelaar, R. M., Bucke, C. und Tramper, J. (Hrsg.). Progress in Biotechnology Volume 11 - Immobilized Cells: Basics and Applications. Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, 19-30.
- Tralle, K. A. und Blumenberg, E. (1998). Nematoden in Zuckerrüben: Resistente Sorten helfen bei der Kontrolle und sichern den Ertrag. Zuckerrübe 47, 1, 34-36.
- Tsuji, K. (1999). Microcapsules in agriculture. In: Arshady, R. (Hrsg.). Microspheres, microcapsules & liposomes. Vol. 1: Preparation & chemical applications. Citus Books, London, Großbritannien, 3, 12, 349-367.
- Tunlid, A., Jansson, H. B. und Nordbring-Hertz, B. (1992). Fungal attachment to nematodes. Mycological Research 96, 401-412.
- U**sami, T., Sano, S. und Yoshida, S. (1999). Microencapsulation in printing and recording. In: Arshady, R. (Hrsg.). Microspheres, microcapsules & liposomes. Vol. 1: Preparation & chemical applications. Citus Books, London, Groß-britannien, 3, 14, 391-416.
- V**elvis, H. und Kamp, P. (1995). Infection of second stage juveniles of potato cyst nematodes by the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* in Dutch potato fields. Nematologica 41, 617-627.
- Vorlop, K.-D. und Klein, J. (1981). Formation of sperical chitosan biocatalysts by ionotropic gelation. Biotechnology Letters 3, 1, 9-14
- Vorlop, K.-D. und Klein, J. (1983). New developments in the field of cell immobilization – formation of biocatalysts by ionotropic gelation. In: Lafferty, R. M. (Hrsg.). Enzyme technology. Springer, Berlin, 219-235.

- Vorlop, K.-D. (1984). Entwicklung von Verfahren zur Polymerfixierung von Mikroorganismen und Anwendung der Biokatalysatoren zur Spaltung von Penicillin G und Synthese von L-Tryptophan. Dissertation Technische Universität Carolo Wilhelmina Braunschweig.
- Vorlop, K.-D., Muscat, A. und Beyersdorf, J. (1992). Entrapment of microbial cells within polyurethane hydrogel beads with the advantage of low toxicity. *Biotechnology Techniques* 6, 483-488.
- Wallhäußer, K. H. (1995). Praxis der Sterilisation, Desinfektion – Konservierung: Keimidentifizierung – Betriebshygiene. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 586-598.
- Wandrey, C. (1996). Why immobilize? In: Wijffels, R. H., Buitelaar, R. M., Bucke, C. und Tramper, J. (Hrsg.). *Progress in Biotechnology Volume 11 - Immobilized Cells: Basics and Applications*. Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, 3-16.
- Webster, J. M. (1987). Introduction. In: Brown, R. H. und Kerry, B. R. (Hrsg.). *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Academic Press, Sydney, Australien, 1-13.
- Weiden, S. (1997). Resistenzgene wirken nur auf Zeit. Handelsblatt vom 11.11.1997.
- Weidenhagen, R. und Lorenz, S. (1957). Palatinose (6-( $\alpha$ -Glucopyranosido)-fructofuranose), ein neues bakterielles Umwandlungsprodukt der Saccharose. *Zuckerindustrie* 7, 533-534.
- Weischer, B. und Steudel, W. (1972). Nematode diseases of sugar beet. In: Webster, J. M. (Hrsg.). *Economic Nematology*. Academic, London, 49-65.
- Whitehead, A. G. (1998). *Plant Nematode Control*. CAB International, Wallingford, Großbritannien.
- Wiesmann, R. (1994). Einfluß der Immobilisierung auf den Stofftransport in biotechnischen Prozessen. *Fortschritt-Berichte VDI Reihe 17 Nr. 113*. VDI Verlag, Düsseldorf.
- Willstätter, R. und Rhodewald (1934). *Hoppe-Seilers Zeitung für physiologische Chemie* 225, 103, zitiert aus Philipp *et al.* 1982.
- Windt, A. und Koch, H. J. (1998). Nematodenresistente Zwischenfrüchte: Anbau unter Berücksichtigung der Bodentemperatur. *Zuckerrübe* 47, 5, 278-279.
- Wirtschaftliche Vereinigung Zucker (1999). *Zucker in Zahlen*. Wirtschaftliche Vereinigung Zucker (Hrsg.), Am Hofgarten 8, D – 53113 Bonn.
- Wixted, D. J., Loria, R. und Kotcon, J. P. (1987). Efficacy of ethoprop on potato and the potential for groundwater contamination. *Journal of Nematology* 19, 563-564.

- Wyss, U. und Voß, B. (1986). Möglichkeiten der biologischen Bekämpfung von Wurzel-nematoden durch Pilze. Schriftenreihe der Agrarwissenschaftlichen Fakultät der Universität Kiel, Heft Nr. 68, 61-71.
- X**ia, J., Dubin, P. L. und Dautzenberg, H. (1993). Light scattering, electrophoresis, and turbidimetry studies of bovine serum albumin-poly(dimethyldiallylammonium chloride) complex. *Langmuir* 9, 2015-2019.
- Y**ao, S., Cho, M. und Buchholz, R. (1993). Umweltfreundliches Herstellungsverfahren von Cellulosesulfat für die Immobilisierung von Mikroorganismen und Enzymen in der Biotechnik. *Chemie Ingenieur Technik* 65, 9, 1124-1125.
- Yao, S. (1995). Verfahrenstechnische Auslegung einer Anlage für die Natrium-Cellulosesulfatherstellung zur Immobilisierung von Biokatalysatoren. *Fortschritt-Berichte VDI Reihe 17 Nr. 138*. VDI Verlag, Düsseldorf.
- Yao, K.-D., Peng, T., Yin, Y.-J. und Xu, M.-X. (1995). Microcapsules/microspheres related to chitosan. *Journal of Material Science Macromolecular Chemistry and Physics* C35, 1, 155-180.
- Young, L. D. und Hartwig, E. E. (1988). Selection pressure on soybean cyst nematode from soybean cropping sequences. *Crop Science* 28, 845-847.
- Z**aki, M. H., Moran, D. und Harris, D. (1982). Pesticides in groundwater: The aldicarb story in Suffolk country, New York. *American Journal of Public Health* 72, 1391-1395.

## 7.2 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie/Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
Alginat (Protalal <sup>®</sup> LF 20/60)	Pronova, Damme, Norwegen
Bäckerhefe, frisch	Deutsche Hefewerke GmbH & Co. OHG, Hamburg
Bäckerhefe, trocken	Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld
Chitosan	siehe 4. 1. 2. 2
Ethanol 96 % vergällt, technisch	Richard Sichler Chemikalien GmbH & Co. KG, Braunschweig
Hefeextrakt (Yeast Extract)	Ohly, Deutsche Hefewerke GmbH & Co. OHG, Hamburg
Inulin	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Kartoffelstärke, feine Speisestärke	Müller's Mühle GmbH, Gelsenkirchen
Maiskleber (Concentra <sup>®</sup> 13883)	Cerestar Deutschland GmbH, Krefeld
MES-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Penicillin G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
pH-Pufferlösungen pH 4,00, pH 7,00	Riedel-de Haën AG, Seelze-Hannover
Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC)	siehe 4. 1. 2. 1
Sterilfilter 0,22 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sterilfilter für Druckluft, 0,20 µm	Nalgene Nunc International, Wiesbaden
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Sulfoethylcellulose (SEC)	siehe 4. 1. 1. 1

Alle nicht aufgeführten Chemikalien sind Produkte der Fa. Merck, Darmstadt.

## 7. 3 Verwendete Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Autoklavi SPA	Fedegari, Albuzzano, Italien
	Tuttnauer Tischautoklav 2450 EL	Systec GmbH, Wettenberg
	SANOclav La S-131 Typ S-EST	Wolf, Geislingen
Blutzucker- schnelltest- gerät (s. 4. 5. 4. 2)	Accutrend alpha	Boehringer, Mannheim
Brutschrank	Heraeus BK 5060 E	Heraeus, Hanau
Cleanbench	Herasafe HS 12	Heraeus, Hanau
Feinwaage	Sartorius analytik A 200S	Sartorius AG, Göttingen
Fermenter (s. 4. 5. 1)	Tisch-Fermentersystem Labfors, wasser- temperiert mit Magnetrührer, Software IRIS NT® 4.0: Master mit Kulturgefaß 7,5/5 l	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
	Meß- und Regelventil für Luft	Brooks Instruments, Veenendaal, Niederlande
	pH-Elektrode	Mettler-Toledo, Gießen
	pO <sub>2</sub> -Elektrode	Mettler-Toledo, Gießen
Glasgeräte	Schott/Duran®	Schott Glaswerke, Mainz
	Simax	Simax, Sázava, Tschechische Republik
Glucose- Analytik (HPLC)  (s. 4. 5. 4. 1)	Pumpe: Shimadzu LC - 10 AT Liquid Chro- matograph	Shimadzu, Duisburg
	Probenaufgabe: Basic Marathon	Spark, Emmen, Niederlande
	Ofen: Shimadzu CTO – 10 A Column-Oven	Shimadzu, Duisburg
	Säule: CHO611 Inter Action	Bio Rad Laboratories, Cambridge, USA
	Detektion: Shimadzu RID – 10 A Refractive Index Detector	Shimadzu, Duisburg
	Steuerung: Shimadzu SCL - 10 A	Shimadzu, Duisburg
	Shimadzu DEGU – 3 A Degaser	Shimadzu, Duisburg
Kugelmühle	Steuersoftware/Integrator: Class-VP 5.0	Shimadzu, Duisburg
	Retsch-Fliehkraftkugelmühle S 1	Retsch, Haan
Magnetrührer	Ikamag REO	IKA Labortechnik, Staufen

Membran-Pumpe	Membranpumpe MZ 2 mit Vakuumfeinregulierkopf	Vacuubrand GmbH + Co., Wertheim
Mikroskop	Phasenkontrastmikroskop Zeiss Axioplan mit Kamera MC 100	Carl Zeiss, Oberkochen
pH-Meter (s. 4. 5. 4. 5)	Microprozessor pH/ION Meter pMX 2000 mit Extender E 2000 und Temperaturfühler TFK 530	Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten (WTW), Weilheim
	Elektrode: Ingold	Ingold, Urdorf, Schweiz
Schreiber (s. 4. 3)	2-Kanalschreiber BBC Goerz Metrawatt SE120	Metrawatt GmbH, Nürnberg
Schüttler (s. 4. 4. 4)	Rundschüttler Infors Multitron (Master und 2 Satelliten)	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Stereolupe (s. 4. 8)	Stereomikroskop SV8	Carl Zeiss, Oberkochen
Trocken-Schrank	memmert UE 700	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Umlaufkühler	Julabo FE 1800	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Vortex	Vortex Genie 2™	Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage	sartorius universal	Sartorius AG, Göttingen
	Kern 770 GS	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Zählkammer (s. 4. 9)	Zählkammer Fuchs-Rosenthal, Tiefe 0,2 mm	Carl Zeiss, Oberkochen
Zentrifuge	eppendorf 5417	Eppendorf, Hamburg

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die interessante Themenstellung, die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen bei der Durchführung sowie die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Technologie und Biosystemtechnik der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) anfertigen zu können.

Herrn PD Dr. Siegmund Lang möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Meinen Dank aussprechen möchte ich folgenden Personen für ihre engagierte Mitarbeit: Herrn cand. Biotechnol. Michael Bippes, Frau cand. Ing. (FH) Angela Daps, Herrn cand. Biotechnol. Ansgar Klene, Frau Elsie Lorilla, Herrn Dipl.-Chem. Burt Neumann und Herrn Dipl.-Ing. (FH) Henning Wendt.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten danke ich besonders Frau Cornelia Krüger und Frau Grazyna Wisniewska.

Frau Insa Franziskus von der Zentralen Informationsbibliothek der FAL gilt mein ganz besonderer Dank für ihre unermüdliche Unterstützung bei der Literatuarbeit.

Den Kollegen der Fahrbereitschaft der FAL danke ich für den reibungslosen Transport des Versuchsmaterials zur BBA nach Münster.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Technologie und Biosystemtechnik der FAL für ihre stete Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Für die gute Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern im FNR-Projekt „Kapselsysteme auf Basis nachwachsender Rohstoffe zur biologischen Schädlingsbekämpfung“ gilt mein Dank Herrn Dr. Joachim Müller, Herrn Dipl.-Biol. Volker Gutberlet und Frau Bettina Salinus vom Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde der Biologischen Bundesanstalt Münster und Herrn Dr. Wolfgang Koch, Herrn Dr. Heiko Thielking und Frau Dr. Anette Nowak von der Wolff Walsrode AG.

Für die finanzielle Unterstützung der Arbeit danke ich der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), Gülzow.

Schließlich gilt besonderer Dank meinen Eltern.





